

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 161106 B

(21) Patentansøgning nr.: 1035/83

(51) Int.Cl.⁵ C 12 P 7/60

// C 12 N 1/20

(22) Indleveringsdag: 28 feb 1983

(41) Alm. tilgængelig: 06 sep 1983

(44) Fremlagt: 27 maj 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 mar 1982 JP 35452/82 05 mar 1982 JP 35453/82 05 mar 1982 JP 35454/82

(71) Ansøger: *Shionogi & Co., Ltd.; 12, 3-chome; Dosho-machi; Higashi-ku; Osaka, JP

(72) Opfinder: Takayasu *Sonoyama; JP, Shigeo *Yagi; JP, Bunji *Kageyama; JP

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 3959076

(57) Sammendrag:

1035-83

Fremgangsmåde til fermenterende eller enzymatisk fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre under anvendelse af levende eller forarbejdede mutanter, der mangler evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre. Mutanten er afledt af 2-keto-L-gluconsyre producerende mikroorganismer af slægten *Corynebacterium*. Fremstillingen gennemføres i nærværelse af nitrater og/eller hydrogendonorer i et forud steriliseret fermenteringssubstrat, hvori en 2,5-diketo-D-gluconsyre producerende mikroorganisme af slægten *Gluconobacter* eller *Erwinia* er blevet dyrket.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre i nærværelse af en levende eller forarbejdet mikroorganisme, der er i stand til at producere 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre, og som tilhører

5 slægten *Corynebacterium*.

Opfinderne af den foreliggende opfindelse har tidligere fundet frem til forskellige mikroorganismer, der er i stand til at fremstille 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre (herefter omtalt som 2-keto-L-gulonsyre producerende stamme (I)), og opfundet fremgangsmåder til

10 fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ved hjælp af disse mikroorganismer (se fx. USA-patentskrift nr. 3.922.194 (RE 30.872), 3.959.076 og 3.963.574). Hver af disse stammer (I) fremstiller imidlertid ud over hovedproduktet, 2-keto-L-gulonsyre, 2-keto-D-gluconsyre som et uønsket biprodukt ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyren. De har også opfundet en blandet

15 dyrkningsfremgangsmåde med det formål at hindre akkumulering af denne uønskede 2-keto-D-gluconsyre i mediet (se fx. USA-patentskrift nr. 3.998.697).

Det har nu overraskende vist sig, at mutanter tilhørende slægten *Corynebacterium*, der i det væsentlige mangler evne til at metabolisere

20 5-keto-D-gluconsyre og i det væsentlige er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre, er i stand til at fremstille 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-di-keto-D-gluconsyre uden væsentlig fremstilling af den uønskede 2-keto-D-gluconsyre.

Opfindelsen angår derfor en fremgangsmåde af den indledningsvis omtalte art, som er ejendommelig ved, at der som mikroorganisme tilhørende

25 slægten *Corynebacterium* anvendes en mutant, der (1) i det væsentlige mangler evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og (2) i det væsentlige er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre.

Med udtrykket "levende eller forarbejdet mikroorganisme" er det

30 hensigten i beskrivelsen og kravene at indbefatte et hvilket som helst forarbejdet produkt, der er fremkommet ved behandling af celler af mikroorganismen såvel som voksende eller hvilende celler. Det forarbejdede produkt kan fx. være en celleduspension, en celleekstrakt, et råt eller rensset enzym eller en cellemask, der er opnået ud fra mikroorganismen.

35 Udtrykket syre skal i forbindelse med alle de syrer, der indgår i fremgangsmåden, forstås således, at det også indbefatter et hvilket som helst salt eller en hvilken som helst ester af syren.

I en foretrukket udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindel-

sen gennemføres dyrkningen af mutanten og omdannelsen af 2,5-diketo-D-gluconsyre til 2-keto-L-gulonsyre i nærværelse af en hydrogendonor eller et nitratsalt. Hydrogendonoren kan sættes til mediet sammen med den 2,5-diketo-D-gluconsyre, der skal sættes til mediet, eller separat. Nitrat-

5 saltet kan sættes til mediet ved dyrkningens begyndelse og/eller ved begyndelsen af 2,5-diketo-D-gluconsyretilsætningen eller på et hvilket som helst tidspunkt under denne.

(1) Frembringelse af mutanten (II)

10 Opfinderne af den foreliggende opfindelse har opnået en mutant (II) afledt af en forældremikroorganismestamme, der er i stand til at fremstille 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre (forældrestamme (I)) ved at behandle forældrestamme (I) på for mutation konventionel måde. Denne mutant (II) er udvalgt således, at den slet ikke eller næsten

15 ikke vokser på 5-keto-D-gluconsyre, men vokser på D-gluconsyre og har vist sig at være ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre. Derfor defineres den her og vil senere blive omtalt som "en mutant, der i det væsentlige mangler evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og i det væsentlige er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre".

20 Når mutanten (II) bringes i kontakt med 2,5-diketo-D-gluconsyre under dyrkningsbetingelser, fremstilles 2-keto-L-gulonsyre nemlig og akkumuleres i en kontaktblanding uden væsentlig ledsagende akkumulering af den uønskede 2-keto-D-gluconsyre.

Et hvilket som helst konventionelt middel til mutation kan anvendes

25 til effektivt at opnå mutanten (II) ud fra (I), herunder eksponering for bestråling med ultraviolette stråler eller røntgenstråler og behandling med et mutagen, såsom N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (N.T.G.), acriflavin, ethylmethansulfonat o.l.

I en udførelsesform fortyndes en suspension af den behandlede stamme (I) først med steriliseret fysiologisk saltvandsopløsning til en passende koncentration efter eventuel senere inkubation, og en portion

30 (0,5-1 ml) af den fortyndede suspension spredes på et minimum (agar) medium indeholdende 0,5-2% D-gluconsyre (samt vitaminer og sporstoffer, der er essentielle for mikroorganismens vækst) og dyrkes derpå. Kolonier dyrket på mediet overføres til et andet minimum (agar) medium indeholdende 0,5-2% 5-keto-D-gluconsyre ved replikaspredningsmetoden, og kolonier, som er ude af stand til at vokse med 5-keto-D-gluconsyre, udvælges

35 dernæst. Cellerne i de udvalgt kolonier mangler fuldstændig den evne til

at udnytte 5-keto-D-gluconsyre, som forældrestammen (I) havde, eller evnen er reduceret til mindre end en tiendedel i forhold til forældrestammen (I).

Det bekræftes yderligere, at hver mutant (II) fremstiller 2-keto-L-gulonsyre uden væsentlig biproduktion af 2-keto-D-gluconsyre under dyrkningsbetingelser i nærværelse af 2,5-diketo-D-gluconsyre.

Som eksempler på mutanter (II), der er opnået på den ovenfor beskrevne måde, kan nævnes en mutant FERM-BP 108, der er afledt af en forældrestamme (I), *Corynebacterium* sp., FERM-P 2770, ATCC nr. 31.090, og en mutant FERM-BP 107, der er afledt af en anden (I), *Corynebacterium* sp., FERM-P 2687, ATCC nr. 31.081 (tabel 1). Detaljerede taksonomiske beskrivelser af disse forældrestammer (I) findes i USA-patentskrifterne nr. 3.959.076 og 3.998.697. Mutanterne FERM-BP 107 og FERM-BP 108 er deponeret i overensstemmelse med Budapest-traktatens bestemmelser.

Tabel 1

(2-keto-L-gulonsyre producerende mikroorganismer (forældre) sat over for mutanter, der i det væsentlige mangler evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og i det væsentlige er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre (mutanter) afledt af førstnævnte).

Forældre	Mutanter
25 <i>Corynebacterium</i> sp. FERM-P 2770 ATCC nr. 31.090	FERM-BP 108
<i>Corynebacterium</i> sp. FERM-P 2687 ATCC nr. 31.081	FERM-BP 107

30 Den ovenfor beskrevne kendsgerning, at fjernelse eller bemærkelsesværdig formindskelse af 2-keto-D-gluconsyre produktionsaktivitet udvirkes ved fjernelse af 5-keto-D-gluconsyre metaboliseringsaktivitet fra forældrestammen, er fælles for alle 2-keto-L-gulonsyre producerende mikroorganismer, der tilhører Coryneform bakteriegruppen (iht. den i Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. udgave, givne definition). Eventuelle yderligere mutanter eller varianter af mutanten (II) kan også anvendes til udøvelse af den beskrevne fremgangsmåde, for så

vidt som de har denne evne. Endvidere kan enhver mikroorganisme, hvori det gen, der udtrykker denne egenskab ved mutanten (II), der er fremstillet ved genkloning, transformation eller cellefusion, anvendes.

5 (2) Omdannelse af 2,5-diketo-D-gluconsyre til 2-keto-L-gulonsyre i nærværelse af mutanten (II)

Enhver af de kendte konventionelle betingelser, der anvendes til dyrkning af forældrestamme (I), behandling af det dyrkede substrat og udvinding af 2-keto-L-gulonsyre fra substratet som fx. beskrevet i USA-
10 patentskrifterne nr. 3.922.194, 3.959.076 og 3.963.574, kan ligeledes anvendes til dyrkning af mutanten (II) og til de efterfølgende trin, med nogle åbenlyse modifikationer.

Der bør ikke lægges særlige begrænsninger på sammensætningen af det næringsmedium, der anvendes til dyrkning af mutanten (II). Fx. kan sukkerarter såsom glukose, saccharose og melasse samt polyhydroxyalkoholer såsom glycerol anvendes som carbonkilde i en koncentration på 0,5-5%, og konventionelle nitrogenholdige substanser såsom majsstøbevæske, pepton, kødekstrakt, ammoniumforbindelser, nitrater o.l. kan anvendes som nitrogenkilde i en koncentration på 0,5-5%. Andre uorganiske salte (fx. salte
15 af calcium, magnesium, kalium, zink, mangan og jern) eller enhver anden faktor, der er i stand til at fremme produktionen af slutproduktet, kan sættes til sammensætningen. Sammensætningen kan variere i afhængighed af den anvendte stammes egenskaber, mængden af råmateriale, 2,5-diketo-D-gluconsyre, og andre ledsagende betingelser.

25 En vandig opløsning af et hvilket som helst salt af 2,5-diketo-D-gluconsyre kan anvendes som råmateriale. Alternativt kan der også anvendes et fermenteringssubstrat opnået ved dyrkning af en mikroorganisme, som er i stand til at producere 2,5-diketo-D-gluconsyre ud fra D-glukose og som kan tilhøre slægten Erwinia eller slægten Gluconobacter
30 (iht. den i Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. udgave, givne definition, og derfor omfattende slægterne Acetomonas, Acetobacter og Gluconobacter iht. 7. udgave) som et cellefrit filtrat eller en ved hjælp af kemikalier steriliseret opløsning (fx. natriumdodecylsulfonat).

Eksempler på sådanne mikroorganismer tilhørende slægten Gluconobacter eller slægten Erwinia er vist i tabel 2 nedenfor.

Tabel 2

	Mikroorganisme	FERM-P	ATCC
5	Acetomononas albosesamea	2439	21998
	Gluconobacter melanogenum IFO 3293	----	-----
	Gluconobacter rubisinosus IFO 3244	----	-----
	Erwinia citreus	5449	31623
	Erwinia punctata	5452	31626
10	Erwinia punctata var.	5450	31624
	Erwinia punctata var.	5451	31625
	Erwinia punctata var.	5453	31627
	Erwinia terreus	5454	31628
	Erwinia terreus var.	5455	31629
15	Erwinia terreus var.	5456	31630
	Erwinia terreus var.	5457	31631

Detaljerede taksonomiske beskrivelser af disse stammer er givet enten i USA-patentskrift nr. 3.998.697 eller europæisk patentskrift nr. 0.046.284.

Prøver af disse mikroorganismestammer samt af de tidligere beskrevne stammer er blevet deponeret hos Fermentation Research Institute, Yatabe, Japan og/eller American Type Culture Collection, Maryland, USA og kan fås fra disse depoter iht. Budapest-traktatens bestemmelser. Mikroorganismer med IFO-nr. kan også fås fra Institute of Fermentation, Osaka, Japan.

Selv om mængden af 2,5-diketo-D-gluconsyre, som skal sættes til mediet, og dens tilsætningsmåde varierer i afhængighed af den anvendte mikroorganisme og de i mediet og under dyrkningen tilstedeværende betingelser, tilsættes 2,5-diketo-D-gluconsyren i almindelighed på én gang eller portionsvis med mellemrum til opnåelse af en samlet koncentration på 1-10% i næringsmediet eller dyrkningssubstratet. Mængden af 2,5-diketo-D-gluconsyre ved hver portionsvis tilsætning indstilles fortrinsvis til en koncentration på 0,05-2% i forhold til den totale mængde af medium eller dyrkningssubstrat på tilsætningstidspunktet.

pH-værdien i mediet eller dyrkningssubstratet kan sædvanligvis holdes på 5,0-9,0 og fortrinsvis på 6,0-8,5 under omdannelsen ved lej-

lighedsvis tilsætning af en alkalisk substans, fx. calciumcarbonat. Alternativt kan en hvilken som helst egnet puffer sættes til mediet ved dyrkningens begyndelse.

Disse betingelser kan med nogle modifikationer anvendes i forbindelse med andre i det følgende beskrevne udførelsesformer for opfindelsen.

(3) Anvendelse af nitratsalt og hydrogendonor ved dyrkningen

Ved udførelsen af fremgangsmåden til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre uden ledsagende akkumulering af 2-keto-D-gluconsyre ved anvendelse af mutanten (II) har opfinderne nu fundet, at produktionen af 2-keto-L-gulonsyre kan forøges bemærkelsesværdigt, og at det molære udbytte af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre også kan forøges bemærkelsesværdigt ved tilsætning af et nitrat til vækstsustratet for mutant (II) og/eller til et medium, hvori mutanten (II) virker på 2,5-diketo-D-gluconsyre, og ved tilsætning af en hydrogendonor til substratet samtidig med tilsætning af 2,5-diketo-D-gluconsyre.

Når mutanten (II) inokuleres og inkuberes i et sådant medium suppleret med 0,1-0,5% nitrat, når væksten af mutant (II) sit maksimum inden for 10-24 timer efter inkubationens begyndelse. Desuden sættes nitrattet til mediet i en koncentration på 0,05-0,5% i en fase, i hvilken væksten når sit maksimum, eller inden for 10 timer efter denne fase. Nitraterne, som kan anvendes ved denne fremgangsmåde, omfatter alkalimetalsalte såsom kaliumnitrat og natriumnitrat, jordalkalimetalsalte såsom calciumnitrat og magnesiumnitrat, og mangannitrat.

Nitrattet kan sættes til næringsmediet på tidspunktet for påbegyndelse af dyrkningen af mutanten (II). Tilsætningen kan også gennemføres på én gang samtidig med tilsætningen af 2,5-diketo-D-gluconsyre eller portionsvis efter tilsætningen. Fortrinsvis kan tilsætningen gennemføres ved dyrkningens begyndelse og ved starten af 2,5-diketo-D-gluconsyretilsætningen. Det har også vist sig, at den ved tilsætning af nitrat opnåede fordel bliver mere udtalt ved tilsætning af en hydrogendonor til mediet samtidig med tilsætningen af 2,5-diketo-D-gluconsyren. Produktionen af 2-keto-L-gulonsyre kan nemlig også forøges bemærkelsesværdigt ved tilsætning af en hydrogendonor.

Som hydrogendonor kan der anvendes et hvilket som helst carbohydrat og en hvilken som helst polyhydroxyalkohol for så vidt som stammen kan

udnytte dem. Det er ønskværdigt at tilsætte hydrogendonoren samtidig med tilsætningen af 2,5-diketo-D-gluconsyre i kombination med 2,5-diketo-D-gluconsyren. Selv om koncentrationen af hydrogendonoren kan variere i afhængighed af betingelserne ved tilsætningen af 2,5-diketo-D-gluconsyren og af den anvendte mutant eller substratet, hvori mutanten er blevet inkuberet, tilsættes hydrogendonoren sædvanligvis i en koncentration i området fra 5% til 50% af mængden af 2,5-diketo-D-gluconsyre, der skal tilsættes.

Fordelen ved tilsætning af nitrattet ifølge opfindelsen kan tilskrive den kendsgerning, at nitrattet deltager i mikroorganismernes stofskifte på carbohydratet eller den organiske syre, der tilsættes som hydrogendonor. Det aktiverer også et system til reduktion af 2,5-diketo-D-gluconsyre til 2-keto-L-gulonsyre i mikroorganismecellerne og spiller en rolle ved en effektiv overførsel af det fra hydrogendonoren frigjorte hydrogen til reduktionssystemet. Uden tilsætning af denne hydrogendonor ville virkningen af en tilsætning af nitrat alene kun være af lille værdi for produktionen af 2-keto-L-gulonsyre, dvs. fordelene af en nitrattilsætning mht. forøgelse af produktionen og til opnåelse af et højt udbytte af 2-keto-L-gulonsyre kan forbedres bemærkelsesværdigt ved blot at tilsætte hydrogendonoren.

Udover de ovenfor beskrevne fordele er nitrattilsætning også effektiv til en forlænget opretholdelse af den forud fastsatte pH-værdi (6,5-8,0) af substratet, hvilken værdi er foretrukket til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre.

Det antages, at nitrattet snarere tjener til forbedring af mikroorganismens metabolisme af hydrogendonoren og bidrager til aktivering og stabilisering af reduktionssystemet end som nitrogenkilde for mikroorganismen.

I almindelighed bedømmes virkningen af en nitrogenholdig forbindelse som nitrogenkilde, der kan udnyttes, ved dens forøgelse af cellekoncentrationen. Blandt lignende uorganiske forbindelser har et ammoniumsalt en meget større virkning på denne forøgelse end nitrattet. Ammoniumsaltet bevirker nemlig en forøgelse af cellekoncentrationen, når det sættes til substratet ved dyrkningens begyndelse eller på tidspunktet for 2,5-diketo-D-gluconsyre tilsætningen, men har kun ringe virkning på forøgelsen af 2-keto-L-gulonsyre produktionen.

I modsætning hertil har nitrattet en mindre virkning på forøgelsen af cellekoncentrationen end ammoniumsaltet, men bidrager til den bemær-

kelsesværdige forøgelse af 2-keto-L-gulonsyre produktionen. Disse virkninger vil senere blive vist i form af eksempler.

5 (4) Sterilisation af 2,5-diketo-D-gluconsyre-fermenteringssubstrat med overfladeaktivt middel

I det videre forløb af udformningen af en kommerciel produktion af 2-keto-L-gulonsyre har opfinderne forsøgt at fremstille 2-keto-L-gulonsyre på effektiv måde ved at tilsætte 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstratet, der blev fremstillet ved dyrkning af stamme (III) (in-
10 deholdende 10^8 - 10^{10} levedygtige celler af (III) pr. ml), direkte til dyrkningssubstratet for mutanten (II)).

Ved dette forsøg blev det fundet, at produktionen af 2-keto-L-gulonsyre inhiberes bemærkelsesværdigt, når mutanten (II) anvendes i den ovenfor beskrevne fremgangsmåde i modsætning til, hvad der er tilfældet,
15 når forældrestammen (I) anvendes. Som et resultat af omfattende undersøgelser er det blevet klart, at inhiberingsfænomenet optræder i et tilfælde, hvor stammen (III) er vokset ud over 10^5 levedygtige celler/ml i processen.

Som en måde at sterilisere stammen (III) i 2,5-diketo-D-gluconsyre
20 fermenteringssubstratet på, kommer termisk sterilisation og sterilisation ved filtrering i betragtning. P.g.a. den termiske instabilitet af 2,5-diketo-D-gluconsyre og høje omkostninger i forbindelse med dårlige praktiske gennemførelsmuligheder for sterilisation ved filtrering ved produktion i kommerciel målestok, har man imidlertid fundet, at en eta-
25 blering af alternative måder til sterilisation af stammen (III) er uundværlig for gennemførelse af en kommerciel produktion af 2-keto-L-gulonsyre. Efter en række forskelligartede studier er yderligere fordele blevet opnået ved tilvejebringelse af en sikker og pålidelig måde til sterilisation af stamme (III) med et overfladeaktivt middel.

30 Dette aspekt af fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse har den fordel, at ingen yderligere faciliteter, der specielt er udformet til sterilisation, er nødvendige til udførelse af fremgangsmåden, det overfladeaktive middel kan let udvælges blandt de mange mulige, således at det ikke vil inhibere produktionen af 2-keto-L-gulonsyre med
35 mutanten (II), og selve det overfladeaktive middel er billigt og let tilgængeligt.

En yderligere fordel består i, at fremgangsmåden let kan udnyttes til produktion i stor målestok.

Af de undersøgte overfladeaktive midler har natriumdodecylsulfat (SDS) vist sig at være specielt at foretrække.

Detaljer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen beskrives kort i det følgende.

- 5 Først inokuleres et medium, der indeholder substratet, D-glucose, en nitrogenkilde såsom majsstøbevæske og uorganisk salt med den 2,5-diketo-D-gluconsyre producerende stamme (III) og dyrkes ved 28°C under omrøring og luftning.

- 10 Dernæst deles fermenteringssubstratet, der er fremstillet som ovenfor beskrevet, i to portioner, og den ene behandles ved aseptisk tilsætning af et af de overfladeaktive midler til opnåelse af en slutkoncentration på 0,01-0,25 vægt/vol-% og får lov at henstå ved 5-28°C i flere timer under lejlighedsvis og moderat omrøring. En anden portion uden tilsat overfladeaktivt middel holdes ligeledes ved 5-28°C i flere timer.

- 15 Ved behandlingen med overfladeaktivt middel, hvor der fx. anvendes natriumdodecylsulfat (SDS), formindskes antallet af levedygtige celler af stammen (III) i det behandlede substrat til mindre end én milliontedel af det antal levedygtige celler, der er til stede i det ubehandlede substrat. Formindskelsen kan imidlertid variere i afhængighed af de anvendte stammer og det anvendte overfladeaktive middel. En del af den
20 anden portion ubehandlet 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrat steriliseres ved filtrering.

- Dernæst tilsættes D-glucose som hydrogendonor aseptisk til henholdsvis det med overfladeaktivt middel behandlede substrat, det ved
25 filtrering steriliserede substrat og det ubehandlede 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrat til opnåelse af en slutkoncentration på 1-10% før substraterne sættes til kulturen af mutanten (II).

- Adskilt herfra dyrkes mutanten (II) i tidsmæssig overensstemmelse med behandlingen af 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstratet med
30 overfladeaktivt middel. Til kulturen af mutanten (II) sættes hver af de i forvejen fremstillede tre 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrater portionsvis hver 15. til 120. minut til opnåelse af en 2,5-diketo-D-gluconsyre koncentration på 0,05-2,0%, mens mængden af 2,5-diketo-D-gluconsyre, der forbliver i substratet, overvåges, og dyrkningen
35 fortsættes i 48 timer efter tilsætningens begyndelse. Både i tilfælde af sterilisation ved behandling med overfladeaktivt middel og ved filtrering omdannes 2,5-diketo-D-gluconsyren problemløst til 2-keto-L-gulonsyre. Alligevel når cellepopulationen af stamme (III) op på mere end 10^5

celler/ml, når der ikke steriliseres, så produktionen af 2-keto-L-gulonsyre standser helt.

- Som vist i de efterfølgende eksempler kan sterilisationen gennemføres ved behandling med overfladeaktivt middel eller ved filtrering. Men da sterilisation ved filtrering af substratet imidlertid kun er mulig ved behandling i laboratoriemålestok, hvis substratet indeholder 2,5-diketo-D-gluconsyre i høj koncentration, anses den næsten for umulig ved gennemførelse af en produktion i kommerciel målestok p.g.a. de høje omkostninger. Derfor har sterilisation med overfladeaktivt middel iht. dette aspekt af opfindelsen vist sig at have store fordele.

I den efterfølgende beskrivelse vil den foreliggende opfindelse blive nærmere belyst ved hjælp af eksempler. Indholdet og rækkefølgen af beskrivelsen er som følger:

- | | | |
|----|----------------|---|
| 15 | Eksempel 1: | Afledning af mutanten (II). |
| | Præparation A: | 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrat. |
| | Præparation B: | Opløsning af Ca-2,5-diketo-D-gluconat. |
| | Eksempel 2: | Anvendelse af mutanten (II) til 2-keto-L-gulonsyreproduktion ved fermentering. |
| 20 | Eksempel 3: | Anvendelse af celleduspension og celleekstrakt af mutanten (II) til 2-keto-L-gulonsyreproduktion ved kontakt. |
| | Eksempel 4: | Tilsætning af et nitratsalt og en hydrogendonor til fermenteringssubstratet. |
| 25 | Eksempel 5: | Sterilisation af 2,5-diketo-D-gluconsyrefermenteringssubstrat med overfladeaktivt middel. |

Analysemetoder

- | | | |
|----|-----|---|
| 30 | (i) | <u>2-keto-L-gulonsyre, 2-keto-D-gluconsyre og 2,5-diketo-D-gluconsyre</u> |
| | (a) | Gas-væskerkromatografi: |
| | | Søjle: SE 52 (5%) Prøve: trimethylsilyleret |
| 35 | | Bæregas: helium |
| | | Temperatur: 160-210°C |

(b) Papir- eller tyndtlagskromatografi:

Bærer: Toyo Roshi nr. 50 eller TLC aluminium-pladecellulose (kan fås fra Toyo Roshi K.K. eller Merck A.G.)

5 Fremkaldelsesopløsningsmiddel:

Phenol: myresyre: vand = 75:4:25

Farvefremkaldelse:

10 Sprøjtning med AHF-opløsning (fremstillet ved opløsning af 0,93 g anilin og 1,66 g phthalsyre i 100 ml vandmættet n-butanol) og opvarmning til 105°C i 2 minutter.

(ii) D-glukose

15 "Glukose-B-test" kan fås fra Wako Junyaku Kogyo K.K.

Eksempel 1

(Afledning af mutanten (II))

20 (1) Flydende medium

En vandig opløsning indeholdende:

	"Bacto" kødekstrakt	1,0%
	"Bacto" pepton	1,0% og
25	NaCl	0,5%

indstilles til pH 7,2. Hver 50 ml sættes portionsvis til en 500 ml konisk kolbe og steriliseres ved 115°C i 20 minutter.

30 (2) Minimum(agar)medium

Et medium med følgende sammensætning indstilles til pH 7,2 og steriliseres ved 115°C i 15 minutter:

	NH ₄ Cl	0,5%
35	NH ₄ NO ₃	0,1%
	Na ₂ SO ₄	0,2%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
	CaCO ₃	0,0001%

12

	KH_2PO_4	0,3%
	K_2HPO_4	0,1%
	Sporstofopløsning *	0,1%
	Vitaminopløsning **	0,1% og
5	Agar	2,0%

* Sporstofopløsning (ingredienser per liter)

	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	88 mg
10	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	37 mg
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	970 mg
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	88 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	270 mg og
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	27 mg

15 ** Vitaminopløsning (ingredienser per liter)

	Thiamin	1,0 mg
	Pantothensyre	10 mg
20	Niacin	10 mg og
	Biotin	0,1 mg

(3) Opløsning af D-gluconsyre og 5-keto-D-gluconsyre

Vandige opløsninger (10%) af natrium-D-gluconat og natrium-5-keto-D-gluconat indstilledes hver til pH 6,8-7,2 og steriliseredes ved filtrering.

(4) Fremgangsmåde til isolering af mutanterne

En løkkefuld af hhv. *Corynebacterium* sp. FERM-P 2770 og *Corynebacterium* sp. FERM-P 2687 inokuleredes i det flydende medium (1) og dyrkedes ved 28°C i 8 timer. Til hvert af de dyrkede medier sættes en forud steriliseret 0,2% vandig opløsning af N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin til opnåelse af en slutkoncentration på 0,02%, og inkubationen fortsættes i yderligere 30 minutter. Det inkuberede medium centrifugeres (10.000 opm, 15 minutter), og cellerne opsamles derfra.

De opsamlede celler vaskedes tre gange med steriliseret fysiologisk saltvand og suspenderedes hver i 10 ml saltvand. Hver 1 ml portion af suspensionen inokuleredes i mediet (1) og dyrkedes ved 28°C i 15 timer.

Kulturen fortyndedes så til 10^2 - 10^3 levedygtige celler per ml med steriliseret saltvand. Dernæst fordeltes hver 0,5-1 ml portion af den fortyndede kultur over en plade med næringsmedium fremstillet ved blanding af D-gluconsyreopløsning (3) med minimum agar mediet (2) i et forhold på 1 til 9 og fik lov til at udvikle sig ved 28°C i 3-5 dage.

Kolonier af de udviklede celler (stamme (1) i tabel 3, der vokser i D-gluconsyre-medium), overførtes med et stykke bomuldsfløjel til en plade med næringsmedium fremstillet ved blanding af 5-keto-D-gluconsyre opløsning (3) med minimum agar mediet (2) i et forhold på 1 til 9. Efter inkubering i 3-5 dage opsamledes cellekolonier, der voksede på D-gluconsyremediet, men ikke på 5-keto-D-gluconsyremediet, og inokuleredes derefter at blive inkuberet i D-gluconsyremediet.

Den således valgte mutant (stamme (2) i tabel 3, der ikke kan vokse på 5-keto-D-gluconsyremediet), inokuleredes i mediet (1) indeholdende 1% 5-keto-D-gluconsyre, og dyrkedes ved 28°C i 24 timer. Den i kulturen tilbageblevne 5-keto-D-gluconsyre bestemtes ved papirkromatografi for at bekræfte, at denne stamme (2) ikke var i stand til at udnytte 5-keto-D-gluconsyre.

Medium (2), der vil blive beskrevet i eksempel 2, inokuleredes med en løkkefuld af den mutant, der havde vist sig at være ude af stand til at udnytte 5-keto-D-gluconsyre (stamme (3) i tabel 3) og inkuberedes i 20 timer. Til dette inkuberede medium sættes den calcium-2,5-diketo-D-gluconatopløsning, som vil blive beskrevet i præparation B til opnåelse af en slutkoncentration på 1,0%, og inkubationen fortsættes i yderligere 24 timer.

Mængden af 2-keto-D-gluconsyre og 2-keto-L-gulonsyre i dyrkningsmediet bestemtes ved papirkromatografi. Resultaterne er vist i tabel 3 nedenfor.

Således opnåedes 308 ønskede mutanter med manglende evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og i det væsentlige ude af stand til at producere 2-keto-D-gluconsyre, ud fra 84.520 kolonier mutageniseret *Corynebacterium* sp. FERM-P 2770, og på lignende måde opnåedes 11 ønskede mutanter ud fra 29.100 kolonier mutageniseret *Corynebacterium* sp. FERM-P 2687.

Tabel 3

5	2-keto-L-gulonsyre producerende mikro- organismer (forældre)	Corynebacterium sp. FERM-P-2770	Corynebacterium sp. FERM-P 2687
		(antal mutantstammer)	
10	Stammer (1), som kan vokse på D-gluconsyremedium	84.520	29.100
	Stammer (2) af sådanne (1), som ikke kan vokse på 5-keto- D-gluconsyremedium	363	45
	Stammer (3) af sådanne (1), som ikke kan udnytte 5-keto- D-gluconsyre	319	13
	Stammer af sådanne (3), som producerer 2-keto-L-gulonsyre, med ikke producerer 2-keto-D- gluconsyre	308	11

20

Præparation A

(2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrat)

(i) Podemedium

25

En vandig opløsning indeholdende:

30	D-glukose	1,0%
	Majsstøbevæske (CSL)	5,0%
	Primært kaliumphosphat (KH_2PO_4)	0,1%
	Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,02% og
	Calciumcarbonat (CaCO_3)	0,5%

indstilledes til pH 6,8-7,0 med 10% NaOH opløsning og opdeltes i 50 ml
 35 portioner, som anbragtes i en 500 ml konisk kolbe respektivt. Podemediet
 steriliseredes ved 120°C i 20 minutter.

(ii) Podekultur

Podemediet (i) i kolben inokuleredes med en løkkefuld *Erwinia punctata* FERM-P 5452 vist i tabel 1 og inkuberedes under omrøring (amplitude 71 mm, 270 opm) ved 28°C i 8-11 timer. Podekulturen afsluttedes på et tidspunkt, da dens optiske tæthed nåede op på ca. 8 (slutpunkt).

(iii) Fermenteringsmedium

En vandig opløsning indeholdende:

	D-glukose	20%
	CSL	3%
	KH ₂ PO ₄	0,1%
15	CaCO ₃	6,3% og
	Antiskumdannelsesmiddel, polypropylenglycol (P-2000)	0,01%

indstilledes til pH 6,8-7,0, steriliseredes ved 120°C i 20 minutter, hver 455 ml portion hældtes aseptisk i en steriliseret 1 l fermenteringsbeholder, og der tilsattes 45 ml af ovennævnte podekultur (ii) til hver portion.

(iv) Fermentering

25

Fermentering gennemførtes ved 28°C med en luftstrømningshastighed på 600 Nml/minut og omrøring ved 1740 opm i 20-30 timer (2,5-diketo-D-gluconsyre-slutkoncentration ca. 19 vægt/vol-%). Substratet centrifugeredes til fjernelse af cellerne, og supernatanten steriliseredes ved filtrering. Dette anvendtes som 2,5--diketo-D-gluconsyre fermenterings-substratet.

(v) Slutpunkt

35 Fermenteringen afsluttedes på et tidspunkt, da den lyserøde plet af 2-keto-D-gluconsyre forsvandt fra et tyndtlagskromatogram af substratet.

Præparation B

(Opløsning af calcium-2,5-diketo-D-gluconat)

En vandig opløsning indeholdende 5% pulveriseret calcium-2,5-diketo-gluconat i en koncentration på 5,0% steriliseredes ved filtrering.

Eksempel 2

(Anvendelse af mutanten (II) til 2-keto-L-gulonsyreproduktion ved fermentering)

10

(1) Podemedium

(fælles for de efterfølgende eksempler)

En vandig opløsning indeholdende:

15

D-glukose	1,0%
"Bacto" gærekstrakt	0,5%
"Bacto" pepton	0,5%
Primært kaliumphosphat (KH_2PO_4)	0,1% og
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,02%

20

indstilles til pH 7-7,2 med 10% NaOH opløsning. Hver 50 ml portion hældtes i en 500 ml konisk kolbe og steriliseredes ved 115°C i 20 minutter.

25

(2) Fermenteringsmedium

En vandig opløsning indeholdende:

D-glukose	1,0%
Majsstøbevæske (CSL)	3,0%
KH_2PO_4	0,1% og
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02%

30

indstilles til pH 7,0-7,2 med 10% NaOH. Hver 50 ml portion anbragtes i en 500 ml konisk kolbe og steriliseredes ved 115°C i 20 minutter.

35

(3) Fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre

Podemediet (1) inokuleredes med en løkkefuld 2-keto-L-gulonsyre-

- producerende mikroorganisme (forælder (I)) eller mutanter (II) afledt fra (I), som er vist i tabel 4, og det inokulerede medium dyrkedes ved 28°C i 24 timer. Dernæst inokuleredes 5 ml af hver podekultur i fermenteringsmediet (2) og dyrkedes. En af opløsningerne af 2,5-diketo-D-gluconsyre (præparationer A og B) sættes til dette fermenteringsmedium til opnåelse af en slutkoncentration på 2% ved fermenteringens begyndelse eller på et hvilket som helst tidspunkt inden for 16 timer efter fermenteringens begyndelse, og fermenteringen fortsættes i yderligere 48 timer.
- 10 Resultaterne af gas-væskeskromatografien af produkterne er sammenfattet i tabel 4 nedenfor. Som vist i tabel 4 påvistes der ingen 2-keto-D-gluconsyre i substraterne for mutant (II), hvorimod der påvistes en betydelig mængde af denne syre i substraterne for forælder (I).

Tabel 4

Akkumuleringer (mg/ml) af 2-keto-L-gulonisyre og 2-keto-D-gluconsyre i substrater, hvori hver af forældrestammerne (I) og hver af mutanterne (II) dyrkedes, bestemt ved den 48. time efter dyrknings begyndelse.

	2-keto-L-gulonisyre producerende mikroorganisme- stammer	Tidspunkt for tilsætning af 2,5-diketo- D-gluconsyre, timer efter dyrknings begyndelse	Vandig opløsning af calcium-2,5-diketo- D-gluconat		Substrat af FERM-P 5452, ATCC 31626	
			(steriliseret ved filtrering)		(steriliseret ved filtrering)	
			2KLG, mg/ml	2KDG, mg/ml	2KLG, mg/ml	2KDG, mg/ml
5	Corynebacterium sp. FERM-P 2770, ATCC nr. 31090	0 16	1,50 3,85	0,46 1,38	1,75 4,10	0,58 1,45
15	5-keto-D-gluconsyre- metabolisme mangelfuld mutant (FERM-BP 108)	0 16	5,20 7,30	0 0	5,33 8,20	0 0
20	Corynebacterium sp. FERM-P 2687, ATCC nr. 31081	0 1	0,28 0,70	0,42 0,70	0,38 0,73	0,24 0,68
25	5-keto-D-gluconsyre- metabolisme mangelfuld mutant (FERM-BP 107)	0 16	0,25 0,83	0 0	0,40 0,86	0 0
30	2KLG: 2-keto-L-gulonisyre, 2KDG: 2-keto-D-gluconsyre.					

Eksempel 3

(Anvendelser af celleduspension og celleekstrakt ved 2-keto-L-gulonsyreproduktion ved kontakt)

5 (1) Podokultur

Det i eksempel 2 (1) beskrevne podemedium inokuleredes med en løk-kefuld af *Corynebacterium* sp. FERM-P 2770 (I) eller af mutanten, der mangler evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og i det væsentlige er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre, FERM-BP 108 (II),
10 og dyrkedes under omrøring i 28°C i 24 timer.

(2) Dyrkning til fremstilling af en celleduspension eller ekstrakt

Det i eksempel 2 (2) beskrevne fermenteringsmedium (455 ml), men yderligere indeholdende 0,01% af antiskumdannelsesmidlet polypropylen-glycol 2000 (P 2000), anbragtes aseptisk i en 1 liter fermenteringsbeholder og inokuleredes med en 45 ml portion af podokultursubstratet (I).
15 Fermentering gennemførtes ved 28°C i 16 timer under omrøring ved 1740 opm og ved en luftstrømningshastighed på 600 Nml/min.

20 (3) Fremstilling af celleduspension

Dyrkningssubstratet (2) centrifugeredes (15.000 opm) til opsamling af celler, som dernæst vaskedes to gange med fysiologisk saltvand. De vaskede celler suspenderedes i 0,05 M Tris-puffer (pH 7,5) til opnåelse af en suspension med $OD_{660\text{ nm}} = 12$.

25

(4) Fremstilling af celleekstrakt

Cellerne, der blev vasket på den under (3) ovenfor beskrevne måde, suspenderedes i 0,05 M Tris-puffer (pH 7,8) til opnåelse af en suspension med $OD_{660\text{ nm}} = 100$, som ledtes gennem en fransk trykcellepresse ved
30 1.000 kg/cm. De intakte celler og celleresterne fjernedes ved centrifugering ved 20.000 G i 30 minutter. Den resulterende supernatant dialyseredes over for 0,05 M Tris-puffer (pH 7,5) i 15 timer og defineredes som en celleekstrakt.

35 (5) Fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre med celleduspension (3)

Otte (8) ml af celleduspension (3) kombineredes med 2 ml Ca-2,5-diketo-D-gluconat-opløsning (præparation B), og blandingen fik lov til at reagere ved 30°C i 15 timer under omrystning. Dernæst centrifugeredes

reaktionsblandingen (15.000 G. 15 min) til fjernelse af cellerne og undersøgtes for tilstedeværelse af 2-keto-L-gulonsyre og 2-keto-D-gluconsyre ved gas-væskerkromatografi. Resultaterne af den kvantitative bestemmelse er vist i tabel 5 nedenfor.

5

Tabel 5

10	Mikroorganismer anvendt til fremstilling af celled suspensionen:	Koncentration i reaktionsblandingen:	
		2-keto-L-gulonsyre	2-keto-D-gluconsyre
	Corynebacterium sp. FERM-P 2770		
15	ATCC 31090	1,93 mg/ml	0,64 mg/ml
	Mutant med manglende evne til at metabolisere af 5-keto-D-gluconsyre, FERM-BP 108	2,65 mg/ml	0 mg/ml

20

(6) Fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre med celleekstrakt (4)

Celleekstrakt (4) (0,5 ml) sættes til 2,5 ml 0,1 M Tris-puffer (pH 7,5) indeholdende 75 μ -mol Ca-2,5-diketo-D-gluconat og 15 μ -mol NADPH (reduceret nicotinamidadenindinucleotidphosphat) og fik lov til at reagere ved 30°C i 16 timer. Resultaterne af den kvantitative bestemmelse af reaktionsblandingen er vist i tabel 6 nedenfor.

30

35

Tabel 6

5	Mikroorganismer anvendt til fremstilling af celleekstrakten:	Koncentration i reaktionsblandingen:	
		2-keto-L-gulonsyre	2-keto-D-gluconsyre
	Corynebacterium sp. FERM-P 2770		
10	ATCC 31090	285 mcg/ml	32 mcg/ml
	Mutant med manglende evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre, FERM-BP 108	356 mcg/ml	0 mcg/ml

15

Ud fra de ovenfor i tabel 5 og 6 viste resultater blev det bekræftet, at 2-keto-L-gulonsyre produceredes ved omsætningerne, hvor enten celled suspensionen (3) eller celleekstrakten (4) blev anvendt.

I begge tilfælde producerer de ud fra forælderen, den 2-keto-L-gulonsyre producerende mikroorganismestamme FERM-P 2770 (I), fremstillede produkter imidlertid 2-keto-D-gluconsyre sammen med 2-keto-L-gulonsyre, mens de ud fra mutanten (II) fremstillede produkter producerer 2-keto-L-gulonsyre, men ikke producerer 2-keto-D-gluconsyre.

25 Eksempel 4

(Tilsætning af et nitrat og en hydrogendonor til fermenteringssubstratet)

(1) 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrat

30 Det ifølge præparation A fremstillede fermenteringssubstrat centrifugeredes (10.000 opm, 15 minutter) til fjernelse af celler, og supernatanten steriliseredes ved filtrering (2,5-diketo-D-gluconsyrekoncentration: 19%).

35 Det steriliserede fermenteringssubstrat blandedes med en steriliseret, vandig D-glukose opløsning (50%) til opnåelse af en slutkoncentration på 3,8% af hydrogendonoren, D-glukose, i substratet.

(2) Fermenteringsmedium

(fælles for de efterfølgende eksempler til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre)

5 En vandig opløsning indeholdende:

	D-glukose	2,0%
	CSL	3,0%
	KH_2PO_4	0,1%
10	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02% og
	Antiskumdannelsesmiddel:	
	polypropylenglycol (P-2000)	0,01%

indstilledes til pH 7,0-7,2, og hver 450 ml portion steriliseredes ved
15 115°C i 20 minutter og anbragtes aseptisk i en 1 liter steriliseret fermenteringsbeholder.

(3) Fremstilling af nitrogenforbindelseadditiver

Natriumnitrat, kaliumnitrat, natriumnitrit og ammoniumchlorid oplø-
20 stes hver for sig i vand til en 10% vandig opløsning af hver, som steriliseredes ved filtrering, til opnåelse af additiverne til medierne ved dyrkningens begyndelse og ved starten af 2,5-diketo-D-gluconsyretilsætningen.

25 (4) Fermentering

(til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre)

Det i eksempel 2 (1) beskrevne podemedium inokuleredes med en løk-
kefuld af en mutant med manglende evne til at metabolisere 5-keto-D-glu-
30 consyre og i det væsentlige ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre, FERM-BP 108 afledt af *Corynebacterium* sp. FERM-P 2770, ATCC nr. 31090, og det inokulerede medium inkuberedes under omrystning ved 28°C i 20-24 timer. Hver 50 ml portion af denne podekultur inokuleredes i fermenteringsmediet (2) og efter aseptisk tilsætning sammen med de forskellige iht. (3) ovenfor fremstillede nitrogenforbindelsesadditiver til op-
35 nåelse af en slutkoncentration på 0,25% dyrkedes den ved 28°C ved en luftstrømningshastighed på 1,2 vvm og 1740 opm i 10-16 timer.

Efter at det ved hjælp af den ovenfor beskrevne kvantitative be-

stemmelse var blevet bekræftet, at D-glukose var forsvundet, tilsattes hvert af nitrogenforbindelsesadditiverne (3) igen til opnåelse af en slutkoncentration på 0,1%. Ydermere tilsattes 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstratet indeholdende 3,8% D-glukose til opnåelse af en
5 slutkoncentration på 0,2% af sidstnævnte.

Derefter tilsattes 2,5-diketo-D-gluconsyre portionsvis til kulturen hvert 15. til 120. minut til opnåelse af en koncentration på ca. 0,2% umiddelbart efter hver tilsætning, mens eliminering af syren fra substratet overvågedes.

10 Tilsætningen af 2,5-diketo-D-gluconsyre tilendebragtes ved den 45. time efter tilsætningens begyndelse, men dyrkningen fortsattes i yderligere 3 timer (total dyrkningstid efter start: 48 timer).

Efter endt dyrkning analyseredes substratet for 2-keto-L-gulonsyre, 2-keto-D-gluconsyre og 2,5-diketo-D-gluconsyre hver for sig ved gaskro-
15 matografi.

Som et resultat blev det bekræftet, at der ikke iagttoges 2-keto-D-gluconsyre i nogen af medierne. Akkumuleringer af 2-keto-L-gulonsyre i substraterne med forskellige nitrogenforbindelseadditiver er sammenfattet i tabel 7 nedenfor.

Tabel 7

Fordele ved forskellige nitrogenforbindelseadditiver til begyndelses-fermenteringsmediet og til samme medium ved begyndelsen af 2,5-diketo-D-gluconsyretilsætning mht. akkumulering af 2-keto-L-gulonsyre (Tallene i tabellen angiver akkumuleringen af 2-keto-L-gulonsyre i mediet, og tallene i parentes angiver det molære udbytte af 2-keto-L-gulonsyre fra prækursor opnået ved følgende formel: (2-keto-L-gulonsyre fremstillet (mol) x 100: 2,5-diketo-D-gluconsyre forbrugt (mol) x 100

	Nitrogenforbindelse tilsat ved begyndelsen af 2,5-diketo-D-gluconsyretilsætning	Nitrogenforbindelse ++sat til begyndelses-fermenteringsmedium	Tilstedeværelse af hydrogendonor (D-glukose)	Ingen	Natrium-nitrat	Kalium-nitrat	Natrium-nitrit	Ammonium-chlorid
				mg/ml %	mg %	mg/ml %	mg/ml %	mg/ml %
10								
15								
20		Ingen	ingen tilsat	8,2 (41) 15,7 (75)	8,9 (43) 22,0 (87)	9,0 (43) 22,1 (86)	3,9 (38) 6,0 (62)	8,9 (46) 16,0 (78)
25		Natriumnitrat	ingen tilsat	8,6 (49) 26,5 (91)	12,1 (48) 40,2 (93)		4,4 (45) 16,0 (88)	9,2 (43) 27,5 (90)
		Kaliumnitrat	ingen tilsat	8,8 (52) 25,8 (92)		12,2 (46) 40,3 (93)		
30		Natriumnitrit	ingen tilsat	3,2 (31) 8,1 (54)			3,6 (38) 7,8 (53)	
		Ammoniumchlorid	ingen tilsat	9,2 (42) 17,0 (78)				9,7 (45) 18,3 (80)

Som vist i tabel 7 ovenfor, hvori der foretages en sammenligning mellem et tilfælde, hvor et nitrat sættes til mediet eller substratet ved fermenteringens begyndelse samt ved starten af 2,5-diketo-D-gluconsyre tilsætningen, og hvor D-glukose, der tjener som hydrogendonor, til-

5 sættes samtidig med tilsætningen af 2,5-diketo-D-gluconsyre, og et andet tilfælde, hvor der ikke foretages tilsætning, er det tydeligt, at akkumuleringen af 2-keto-L-gulonsyre i substratet forøges fra 8,2 mg/ml til 40 mg/ml (en ca. femfold forøgelse) og udbyttet (mol-%) af 2-keto-L-gulonsyre forøges fra 41 til 93%.

10 Cellekoncentrationen måles som optisk tæthed (O.D.) på det tidspunkt, hvor D-glukose forsvinder fra substratet som sammenfattet i tabel 8 nedenfor, der viser, at nitrattet ikke er effektiv som nitrogen-næringskilde. Som vist i tabel 8 når forøgelsen ved tilsætning af ammoniumsaltet ca. 40%, selvom forøgelsen af cellekoncentrationen ved til-

15 sætning af nitrattet er begrænset til kun 11,6%. Dette faktum viser, at virkningen af nitrattet som nitrogenkilde er mindre end virkningen af ammoniumsalt.

De ovenfor anførte konstateringer bekræfter, at tilsætning af nitrat til mediet kun har ringe virkning på forøgelsen af cellekoncentrationen, men har store fordele hvad angår forøgelsen af 2-keto-L-gulonsyre-reproduktionen og til forbedring af molært udbytte ved omdannelse af 2,5-diketo-D-gluconsyre til 2-keto-L-gulonsyre.

Tabel 8

25 Virkning af additiverne tilsat ved dyrkningens begyndelse på mikroorganismevæksten (Tallene i tabellen angiver cellekoncentrationen på det tidspunkt, hvor D-glukose forsvinder udtrykt som optisk tæthed (O.D.) målt ved 660 nm)

30	Tilsætninger ved dyrkningens begyndelse	Optisk tæthed (O.D.)
	Ingen	13,7
	Natriumnitrat	15,3
35	Kaliumnitrat	15,0
	Natriumnitrit	11,1
	Ammoniumchlorid	19,3

Eksempel 5

(Sterilisering af 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrat med overfladeaktivt middel)

- 5 Det iht. præparation A fremstillede substrat opdeltes i flere portioner umiddelbart efter dyrkningens afslutning. Hvert af de anførte overfladeaktive midler sættes aseptisk til hver portion af substratet til opnåelse af en slutkoncentration på 0,025 vægt/vol-%. De anvendte overfladeaktive midler er vist i tabel 9 nedenfor.
- 10 Behandlingen med overfladeaktive midler gennemførtes under lejlighedsvis omrøring ved 28°C i 6 timer. Et af disse 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrater, der var blevet behandlet med SDS, anvendtes ved 2-keto-L-gulonsyre-fermenteringen med mutant (II), hvilket vil blive beskrevet senere.
- 15

Tabel 9

Baktericid virkning af forskellige overfladeaktive midler på stamme (III) FERM-P 5452

20 Overfladeaktivt middel (0,025 vægt/vol-%)	Formindskelse i antallet af levedygtige celler/ml	
	I begyndelsen	Efter behandling ved 28°C i 6 timer
25		
Intet	$2,3 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$
Natriumdodecylsulfat (SDS)	"	$7,5 \times 10^3$
Fedtsyresorbitat (Span 60, kan fås fra Kao Atlas K.K.)	"	$2,2 \times 10^5$
30 Natriumstearat	"	$1,7 \times 10^8$
Natriummyristat	"	$1,6 \times 10^8$
	HS 210	" $3,8 \times 10^4$
	HS 215	" $4,5 \times 10^4$
35 Nonion	HS 230	" $6,7 \times 10^4$
(kan fås fra Nihon	L 4	" $2,1 \times 10^5$
Yushi K.K.)	NS 240	" $5,0 \times 10^5$

(1) Tilsætning af D-glukose til 2,5-diketo-D-gluconsyrefermenterings-substrat

En vandig D-glukoseopløsning (50%) sættes til hvert af de med SDS behandlede fermenteringssubstrater, det ved filtrering steriliserede fermenteringssubstrat og det ubehandlede substrat til opnåelse af en slutkoncentration på 3,8% individuelt umiddelbart før tilsætning af substratet til dyrkningssubstratet for mutant (II). Disse 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstrater vil i det følgende blive betegnet som "substratopløsning" og anvendes som råmateriale til fremstilling af 2-keto-gulonsyre.

(2) Fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre med mutant (II)

(i) Podekultur

Det i eksempel 2 (1) beskrevne podemedium inokuleredes med en løk-kefuld af mutanten med manglende evne til at metabolisere 5-keto-gluconsyre og i det væsentlige ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre (II), FERM-BP 108, afledt af *Corynebacterium* sp. FERM-P 2770, ATCC nr. 31090, og inkuberedes ved 28°C i 20-24 timer under omrøring (amplitude 71 mm, 270 opm).

(ii) Fermentering (a)

Det i eksempel 4 (2) beskrevne fermenteringsmedium, men yderligere indeholdende 0,2% natriumnitrat, inokuleredes med en 50 ml portion af podekulturopløsningen og inkuberedes ved 28°C i 10-16 timer ved en luftstrømningshastighed på 600 N ml/min. og omrøring (1740 opm).

30

(iii) Fermentering (b)

Efter at D-glukosen var opbrugt og elimineret fra kulturen af mutant (II), FERM-BP 108, sættes hver af de iht. (1) ovenfor fremstillede substratopløsninger separat til kulturen, således at 2,5-diketo-D-gluconsyrekoncentrationen var 0,2%.

Dernæst sættes substratopløsningen portionsvis til kulturen hvert 15. til 120. minut, mens elimineringen af mængden af 2,5-diketo-D-glu-

consyre i kulturen overvågedes, til opnåelse af en koncentration på ca. 0,2% umiddelbart efter hver tilsætning.

Tilsætningen af substratopløsningen afsluttedes ved den 45. time, men dyrkningen fortsattes i yderligere 3 timer, hvilket gav en samlet
5 dyrkningstid fra tilsætningens begyndelse på 48 timer.

Der toges aseptiske prøver af fermenteringssubstratet med forud bestemte mellemrum til at analysere for 2,5-diketo-D-gluconsyre og 2-keto-L-gulonsyre, og levedygtige celler i prøverne taltes (måling (3)).

Resultaterne af analysen og målingerne er sammenfattet i tabel 10.

Tabel 10

Tid efter påbegyndelse * af tilsætningen af 25DKG fermenteringssubstrat (h)

Baktericid behandling af 25DKG fermenteringssubstrat

		Ubehandlet	Behandling med SDS	Sterilisation ved filtrering
5	8	2KLG, produceret (mg/ml) Antal levedygtige celler af stamme (III) (celler/ml)	10,2	10,8
10			8,9 x 10 ³	10,9
15	24	2KLG, produceret (mg/ml) Antal levedygtige celler af stamme (III) (celler/ml)	14,8	18,6
20			2,3 x 10 ⁵	18,7
	48	2KLG, produceret (mg/ml) Antal levedygtige celler af stamme (III) (celler/ml)	15,8	3,5 x 10 ³
25			3,1 x 10 ⁷	26,6
				2,2 x 10 ⁴
				ikke påvist

* 25DKG: 2,5-diketo-D-gluconsyre

** 2KLG: 2-keto-L-gulonsyre

DK 161106 B

(3) Tælling af antallet af levedygtige celler af stamme (III)

Prøver på fermenteringssubstratet fortyndedes med steriliseret fysiologisk saltvand og fordeltes over et glycerin-bouillon-agar-medium, som derefter inkuberedes ved 28°C i 24-36 timer. De levedygtige celler
5 på mediet taltes som kolonier.

Bemærk: Da stammens (III) væksthastighed er meget højere end mutans (II), kan celler af stamme (III), der er sammenblandet med celler af mutant (II), tælles separat uden væsentlige vanskeligheder.

Ud fra resultaterne af de ovenfor beskrevne forsøg kan følgende
10 fakta bekræftes:

(1) Af de forskellige overfladeaktive midler, der er blevet foreslået og bedømt som baktericide midler for stamme (III) i 2,5-diketo-D-gluconsyre fermenteringssubstratet, er SDS (natriumdodecylsulfat) det mest fremragende hvad angår baktericid virkning (se tabel 9).

15 (2) Resultaterne (se tabel 10) af forsøgene til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre, hvori der anvendes de tre slags substratopløsninger, der er fremstillet under de ovenfor anførte betingelser:

i) i et fermenteringsforsøg, hvor den ubehandlede substratopløsning anvendtes, nåede antallet af levedygtige celler af stamme
20 (III) op på 10^5 - 10^7 celler/ml inden for 24 timer efter påbegyndelsen af tilsætningen af substratopløsningen, mens akkumuleringen af 2-keto-L-gulonsyre næsten ikke forøgedes efter 24 timer i sammenligning med de andre to forsøg,

ii) i et fermenteringsforsøg, hvor den SDS-behandlede substratopløsning tilsattes, kontrolleredes forøgelsen i antallet af levedygtige celler af stamme (III) effektivt til mindre end 10^4 celler/ml endda efter 48 timer fra begyndelsen af tilsætningen af substratopløsningen, og akkumuleringen af 2-keto-L-gulonsyre nåede op på ca. 27
mg/ml,

30 iii) akkumulering af 2-keto-L-gulonsyre i ii) ovenfor er ækvivalent med akkumuleringen i et fermenteringsforsøg, hvor der anvendtes den ved filtrering steriliserede substratopløsning, og

iv) i det sidstnævnte fermenteringsforsøg, hvor der tilsættes en ved filtrering steriliseret substratopløsning, påvistes selvfølgelig
35 ingen levedygtige celler af stamme (III), og fremstillingen af 2-keto-L-gulonsyre forløb uden vanskelighed.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre i nærværelse af en levende eller forarbejdet mikroorganisme, der er i stand til at producere 2-keto-L-gulonsyre ud fra 2,5-diketo-D-gluconsyre, og som tilhører slægten *Corynebacterium*, KENDETEGNET ved, at der som mikroorganisme anvendes en mutant, der (1) i det væsentlige mangler evne til at metabolisere 5-keto-D-gluconsyre og (2) i det væsentlige er ude af stand til at fremstille 2-keto-D-gluconsyre.

10

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at mutanten er *Corynebacterium* sp. FERM-BP 107.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at mutanten er *Corynebacterium* sp. FERM-BP 108.

15

4. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af de foregående krav, KENDETEGNET ved, at mutanten dyrkes i et vandigt næringsmedium, hvortil der sættes 2,5-diketo-D-gluconsyre.

20

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, KENDETEGNET ved, at 2,5-diketo-D-gluconsyren tilsættes i form af et fermenteringssubstrat, som er fremstillet ved dyrkning af en 2,5-diketo-D-gluconsyreproducerende mikroorganisme tilhørende slægten *Gluconobacter* eller *Erwinia* i et næringsmedium indeholdende D-glukose.

25

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, KENDETEGNET ved, at der som 2,5-diketo-D-gluconsyreproducerende mikroorganisme er anvendt *Acetomonas al-bosamea* ATCC 21998, *Gluconobacter melanogenum* IFO 3293, *Gluconobacter rubisinosus* IFO 3244, *Erwinia citreus* ATCC 31623, *Erwinia punctata* ATCC 31626, *Erwinia punctata* var. ATCC 31624, *Erwinia punctata* var. ATCC 31625, *Erwinia punctata* var. ATCC 31627, *Erwinia terreus* ATCC 31628, *Erwinia terreus* var. ATCC 31629, *Erwinia terreus* var. ATCC 31630 eller *Erwinia terreus* var. ATCC 31631.

35

7. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af de foregående krav, KENDETEGNET ved, at dyrkningen af mutanten og omdannelsen af 2,5-diketo-D-gluconsyre til 2-keto-L-gulonsyre gennemføres i nærværelse af et ni-

tratsalt eller en hydrogendonor.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, at nitratsaltet er af et alkalimetal eller et jordalkalimetal.

5

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, KENDETEGNET ved, at nitratsaltet er natriumnitrat eller kaliumnitrat.

10. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 7-9, KENDETEGNET ved, at koncentrationen af nitratsaltet er 0,05 - 0,5 vægt/vol-%.

10

11. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 7-10, KENDETEGNET ved, at hydrogendonoren er udvalgt blandt carbohydrater og polyhydroxyalkoholer.

15

12. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 7-11, KENDETEGNET ved, at hydrogendonoren er udvalgt blandt glycerin, glukose, fruktose, saccharose og melasse.

13. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 7-12, KENDETEGNET ved, at hydrogendonoren er til stede i en mængde på 5-50% af 2,5-diketo-D-gluconsyren.

20

14. Fremgangsmåde ifølge krav 5 eller 6, KENDETEGNET ved, at 2,5-diketo-D-gluconsyrefermenteringssubstratet er steriliseret med et overfladeaktivt middel før tilsætningen.

25

15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, KENDETEGNET ved, at der som overfladeaktivt middel er anvendt natriumdodecylsulfat (SDS).

30

16. Fremgangsmåde ifølge krav 15, KENDETEGNET ved, at SDS er anvendt i en koncentration på 0,01 - 0,25 vægt/vol-%.

17. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at mikroorganismen anvendes i form af en celleduspension.

35

18. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at mikroorganismen anvendes i form af en celleekstrakt.