



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8004677**

Nederland

⑲ **NL**

⑤4 **Bereiding van 2,5-diketogluconzuur.**

⑤1 Int.Cl³.: C12P7/58.

⑦1 Aanvrager: Pfizer Inc. te New York.

⑦4 Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8004677.

②2 Ingediend 19 augustus 1980.

③2 Voorrang vanaf 28 september 1979, 10 april 1980.

③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).

③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 79665 , 139036 .

②3 --

⑥1 --

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 31 maart 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Bereiding van 2,5-diketogluconzuur.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van 2,5-diketogluconzuur, dat bruikbaar is als een tussenprodukt bij de bereiding van ascorbinezuur. Een oplossing van 2,5 diketogluconzuur kan selectief gereduceerd worden tot 2-keto-
 5 gulonzuur, dat kan worden omgezet in ascorbinezuur. De reductie van 2,5-diketogluconzuur kan worden uitgevoerd door reductie met een alkalimetaalboorhydride, zoals beschreven in Amerikaans octrooi-schrift 4.159.990, of door een fermentatieve reductie zoals bijvoor-beeld beschreven in de Amerikaanse octrooischriften 3.922.194,
 10 3.959.076 en 3.963.574.

2,5-Diketogluconzuur is ook bruikbaar als een tussenprodukt voor de bereiding van comeenzuur door verwarmen in aanwezigheid van een zuur, zoals bijvoorbeeld beschreven in Ameri-
 kaans octrooischrift 3.654.316.

15 Tot nu toe is 2,5-diketogluconzuur bereid met verscheidene verschillende variëteiten van bacteriën, zoals Aceto-bacter melanogenum, Acetobacter aurantium, Gluconoacetobacter rubiginosus, Gluconoacetobacter liquifaciens en Pseudomonas sesami. Het gebruik van deze micro-organismen is echter niet bevredigend
 20 vanuit een industrieel standpunt wegens betrekkelijk geringe opbreng-
 sten aan 2,5-diketogluconzuur, betrekkelijk lange fermentatieduur en wegens de vorming van grote hoeveelheden bruine of geelbruine pigmenten als nevenprodukten van de kweek, waardoor de zuiverheid van het gewenste 2,5-diketogluconzuur wordt verminderd.

25 Amerikaans octrooischrift 3.790.444 heeft betrek-
 king op de bereiding van 2,5-diketogluconzuur zonder bijkomend bruin pigment, met een nieuwe speciës aangeduid als Acetobacter fragum ATCC no. 21409.

Amerikaanse octrooiaanvraag serie no. 79.668 van

28 september 1979 heeft betrekking op de bereiding van 2,5-diketo-
gluconzuur in goede opbrengst zonder de vorming van gepigmenteerd
materiaal door de aerobe kweek van Acetobacter cerinus in een
glucose-bevattend medium. Ofschoon totale hoeveelheden glucose van
5 2,5-20 gew.% gebruikt kunnen worden, is gevonden, dat de oorspronke-
lijke glucoseconcentraties in het medium van meer dan 15 gew.%
door de micro-organismen niet worden verdragen. Derhalve kunnen
totale hoeveelheden glucose van meer dan 15 gew.% alleen maar
worden gebruikt door de fermentatie uit te voeren bij een oorspron-
10 kelijke glucoseconcentratie van 10-15 gew.% en daarna toevoegen
van aanvullende hoeveelheden glucose aan het fermentatiemedium
tijdens het verloop van de fermentatie, waarbij de glucoseconcentra-
tie in het medium op geen enkel tijdstip meer dan 15 gew.% bedraagt.
Zodoende werden tot nu toe de totale concentraties of produktiever-
15 mogens van 2,5-diketogluconzuur beperkt door de betrekkelijk geringe
oorspronkelijke glucoseconcentratie die gebruikt kan worden in het
fermentatiemedium. De produktiviteit van processen die gebruik maken
van andere micro-organismen voor de bereiding van 2,5-diketoglucon-
zuur, zoals hierboven beschreven, is ook beperkt door de noodzaak
20 om betrekkelijk geringe oorspronkelijke glucoseconcentraties in het
fermentatiemedium te gebruiken.

Het zal duidelijk zijn, dat een werkwijze waarin
de oorspronkelijke glucoseconcentraties hoger dan 15 gew.%, in het
bijzonder meer dan 20 gew.% bedragen, en die door de micro-organismen
25 voor de bereiding van 2,5-diketogluconzuur worden verdragen en ge-
bruikt, een aanzienlijke verhoging van het produktievermogen ver-
schaffen en leiden tot aanmerkelijke produktiebesparingen. Een
dergelijke werkwijze vermijdt ook de mogelijkheid van verontreiniging
van het fermentatiemedium, die zou kunnen optreden, wanneer het
30 produktievermogen wordt verhoogd door toevoegen van aanvullende
hoeveelheden glucose tijdens het verloop van de fermentatie.

In overeenstemming met de uitvinding is nu gevon-
den, dat oorspronkelijke glucoseconcentraties van meer dan 20 gew.%
tot ongeveer 30 gew.% in een fermentatiemedium gebruikt kunnen wor-
35 den door het micro-organisme Acetobacter cerinus voor de bereiding

van 2,5-diketogluconzuur, wanneer tenminste 0,04 gew.% choline, betrokken op de hoeveelheid D-glucose in het medium, aan het fermentatiemedium wordt toegevoegd. Meer in het bijzonder verschaft de uitvinding een werkwijze voor de bereiding van 2,5-diketogluconzuur in hoge concentraties in het fermentatiemedium door aeroob kweken van Acetobacter cerinus in een fermentatiemedium dat D-glucose bevat in oorspronkelijke concentratie van meer dan 20 gew.% tot ongeveer 30 gew.% en choline in een hoeveelheid van tenminste 0,04 gew.%, betrokken op de hoeveelheid D-glucose in het medium. De oorspronkelijke glucoseconcentratie in het medium bedraagt bij voorkeur 25-30 gew.%. Het kweken wordt bij voorkeur uitgevoerd bij een temperatuur van 25-30° C, en bij voorkeur bij een pH van 5-6. Voorkeursstammen zijn Acetobacter cerinus of Acetobacter cerinus IFP 3263 en IFO 3266.

2,5-Diketogluconzuur wordt met de werkwijze volgens de uitvinding in goede opbrengst bereid zonder de vorming van significante hoeveelheden gepigmenteerd materiaal en in een betrekkelijk korte fermentatieduur. Een aantal stammen van Acetobacter cerinus, met inbegrip van IFO 3262 (ATCC 12303) IFO 3263, IFO 3264, IFO 3265, IFO 3266, IFO 3267, IFO 3268 en IFO 3269 zijn publiek verkrijgbaar en kunnen bij de werkwijze volgens de uitvinding worden gebruikt voor het bereiden van 2,5-diketogluconzuur. Stammen waaraan in het bijzonder de voorkeur wordt gegeven zijn IFO 3263 en IFO 3266. Het zal duidelijk zijn, dat mutanten van deze micro-organismen die gevormd zijn volgens gebruikelijke methoden, bijvoorbeeld door bestralen met röntgenstralen of ultraviolet licht, behandeling met stikstof mosterd of dergelijke ook bruikbaar zijn bij de werkwijze volgens de uitvinding en deel uitmaken van de uitvinding.

De Acetobacter cerinus wordt gekweekt in een medium waarvan de hoofd koolstofbron D-glucose is. Het zal duidelijk zijn, dat in overeenstemming met gebruikelijke fermentatiepraktijk, het fermentatiemedium ook bronnen bevat voor stikstof, kalium, fosfor en magnesium. De uitdrukking "fermentatiemedium" in de beschrijving en de conclusies beoogt een medium te definiëren dat dergelijke verbindingen bevat. Bij gebruiken van de Acetobacter cerinus micro-organismen bij de werkwijze volgens de uitvinding is het niet

noodzakelijk om kostbare organische stikstofbronnen, zoals pepton of vleesextract te gebruiken. De stikstof kan economisch worden verschaft door het gebruik van ureum of anorganische stikstofbronnen, zoals ammoniumsulfaat, ammoniumnitraat, ammoniumfosfaat of dergelijke zouten, in het algemeen in een hoeveelheid van 0,1-2 g/l fermentatiemedium, indien nicotinezuur ook als een groeifactor wordt toegevoegd, in het algemeen in een hoeveelheid van 0,2-10 mg/l fermentatiemedium. Het kalium, magnesium en de fosfor worden gemakkelijk verschaft door het toevoegen van zouten, zoals kaliumfosfaat, ammoniumfosfaat, magnesiumsulfaat of dergelijke zouten, in het algemeen in een hoeveelheid van 0,1-1 g/l fermentatiemedium. Aanzienlijke variaties in de samenstelling van het fermentatiemedium is echter mogelijk. Andere geschikte media liggen voor de vakman voor de hand en de werkwijze volgens de uitvinding wordt niet beperkt door het gebruik van de hierboven en in de voorbeelden beschreven bepaalde media. In overeenstemming met de uitvinding bevat het fermentatiemedium D-glucose in een oorspronkelijke concentratie, die hoger is dan tot nu toe mogelijk was zonder schadelijke werking op de bij de fermentatie gebruikte micro-organismen. In het bijzonder ligt de bij de werkwijze volgens de uitvinding gebruikte oorspronkelijke D-glucoseconcentratie in het fermentatiemedium in het traject van 20 gew.% tot ongeveer 30 gew.%, meer in het bijzonder 25-30 gew.%. Desgewenst kan D-glucose worden toegevoegd als cerelese (D-glucose monohydraat).

Om er voor te zorgen dat de Acetobacter cerinus micro-organismen in staat zijn dergelijke hoge glucoseconcentraties in het fermentatiemedium te verdragen en te gebruiken, is het noodzakelijk om choline aan het fermentatiemedium toe te voegen in een hoeveelheid van tenminste 0,04 gew.%, betrokken op de oorspronkelijke hoeveelheid D-glucose in het fermentatiemedium. Desgewenst kunnen betrekkelijk hoge gehalten choline, bijvoorbeeld 0,5 gew.%, betrokken op de oorspronkelijke D-glucoseconcentratie in het fermentatiemedium, worden gebruikt, ofschoon het weinig voordeel biedt om meer dan 0,1 gew.% choline te gebruiken en in het algemeen verdient het de voorkeur 0,04-0,06 gew.% choline te gebruiken. Choline

kan ofwel als vrije base of als een zout, bijvoorbeeld als cholinechloride, cholinebicarbonaat, cholinecitraat, cholinegluconaat of een dergelijk zout, worden toegevoegd. Als zout wordt de voorkeur gegeven aan cholinechloride. De cholineconcentratie in de beschrijving en conclusies wordt gedefinieerd als berekend als choline base. Een klein deel van het benodigde choline kan desgewenst worden verschaft door het toevoegen van maïsweekvloei-stof aan het fermentatiemedium. Maïsweekvloei-stof, die gebruikt is in fermentatiemedi-
 5 medium. Maïsweekvloei-stof, die gebruikt is in fermentatiemedi-
 een bron voor vitaminen en mineralen, bevat in het algemeen slechts
 10 0,5-3 mg choline per g maïsweekvloei-stof. Gewoonlijk wordt echter
 niet meer dan 5 g maïsweekvloei-stof gebruikt per liter fermentatiemedium, omdat maïsweekvloei-stof kleurstoffen bevat en de toevoeging
 van meer dan 5 g maïsweekvloei-stof per liter fermentatiemedium het
 terugwinnen en zuiveren van het 2,5-diketogluconzuur moeilijker
 15 maakt. Derhalve kan desgewenst maïsweekvloei-stof alleen maar worden
 gebruikt als een bron van een klein gedeelte van het benodigde choline voor de fermentatie en de rest van de benodigde hoeveelheid
 choline wordt toegevoegd aan het fermentatiemedium als choline base
 of een zout daarvan, zoals hierboven beschreven.

20 De fermentatie wordt in het algemeen uitgevoerd
 bij een temperatuur van 20-35° C, bij voorkeur 25-30° C, liefst
 omstreeks 28° C. De oorspronkelijke pH van een kweekmedium ligt in
 het traject van 3,5-7,5, bij voorkeur 5-6. Tijdens het verloop van
 de fermentatie is het wenselijk dat de pH in dit traject wordt ge-
 25 handhaafd, bij voorkeur bij omstreeks 5,5, bij-voorbeeld door toe-
 voeging van een alkalimetaalhydroxyde, bij voorkeur natriumhydroxyde-
 oplossing. In plaats daarvan kan een alkalimetaal of aardalkalime-
 taalcarbonaat, bij voorkeur calciumcarbonaat worden gebruikt voor
 het regelen van de pH en dit wordt voor dit doel toegevoegd bij
 30 het aanvullen van het medium nadat dit in een autoclaaf in een vol-
 doende hoeveelheid is behandeld om de gewenste pH te verschaffen,
 in het algemeen 20-30 g/100 g glucose. Het zal duidelijk zijn, dat
 het 2,5-diketogluconzuur in dergelijke fermentatiemedi-
 a wordt in de vorm van het overeenkomstige alkali of aardalkalimetaal-
 35 zout, zoals het natrium of calciumzout, en dat dergelijke zouten

vallen onder het gebruik van de uitdrukking "2,5-diketogluconzuur" in beschrijving en conclusies.

Na enten wordt het fermentatiemedium geroerd, bijvoorbeeld met een mechanische roerder, en belucht, bij voorkeur met een snelheid van 0,5-1 vol. lucht per vol. fermentatiebouillon per minuut. Desgewenst kan aanvullend glucose tijdens het verloop van de fermentatie worden toegevoegd om een gedeelte van de gebruikte glucose tijdens de fermentatie te vervangen, waardoor de totale concentratie aan verkregen 2,5-diketogluconzuur in de fermentatiebouillon toeneemt.

De fermentatie wordt voortgezet tot de gewenste opbrengst is verkregen. Bij gebruik van Acetobacter cerinus IFO 3263 of 3266 levert bijvoorbeeld een fermentatieduur van 40-50 uur een opbrengst van 90-95 % 2,5-diketogluconzuur, betrokken op D-glucose. Enige variatie in reactieduur en opbrengst valt echter te verwachten, afhankelijk van de bepaalde stam van het micro-organisme, de glucoseconcentratie in het fermentatiemedium en de kweektemperatuur.

Ofschoon wij ons niet vast wens te leggen op een bepaalde mechanisme, nemen wij aan, dat de omzetting van glucose in 2,5-diketogluconzuur verloopt langs de volgende wegen: glucose $\rightarrow$ 2-ketogluconzuur $\rightarrow$ 2,5-diketogluconzuur
glucose $\rightarrow$ 5-ketogluconzuur $\rightarrow$ 2,5-diketogluconzuur. De tussenproducten 2-ketogluconzuur en 5-ketogluconzuur en 2,5-diketogluconzuur zelf kunnen worden gescheiden met papier-chromatografie met gebruikmaking van Whatman no. 1 en no. 4 papier en een oplosmiddelsysteem van methylethylketon:aceton:mierezuur:water (80:6:2:12). De zuurvlekken worden vastgesteld door besproeien met een 0,2 %-ige o-fenyleendiamine ethanolische oplossing die 1 % salpeterzuur bevat en verwarmen op omstreeks 70° C (5-ketogluconzuur-blauw; 2-ketogluconzuur-geel; 2,5-diketogluconzuur-groen). Hogedruk-vloeistofchromatografie kan ook worden gebruikt. Met gebruikmaking van de bovenstaande methoden kan het verloop van de fermentatie worden gevolgd.

2,5-Diketogluconzuur kan worden afgescheiden en worden teruggewonnen uit de uiteindelijke fermentatiebouillon met iedere de vakman bekende gebruikelijke methode. De fermentatie-

bouillon kan bijvoorbeeld worden gefiltreerd, de pH van het waterige filtraat worden ingesteld op 2-2,5 door toevoegen van een mineraal zuur, zoals zoutzuur, gevolgd door concentratie van de oplossing en toevoegen van een korte keten alkylalcohol, bij voorkeur ethanol of methanol. Bij staan scheidt 2,5-diketogluconzuur zich in de vorm van zijn calcium of natriumzout als een vaste stof uit de oplossing af. Het 2,5-diketogluconzuur als zodanig kan uit zijn zout worden verkregen door behandeling met een verdund mineraal zuur, gevolgd door bijvoorbeeld behandeling met een kation-uitwisselingshars, zoals een sulfonzure hars, bijvoorbeeld Dowex 50 (handelsmerk).

Desgewenst kan de fermentatiebouillon worden verwerkt om het gevormde 2,5-diketogluconzuur om te zetten in andere gewenste produkten, bijvoorbeeld door fermentatieve reductie tot 2-ketogulonzuur, zoals beschreven in de Amerikaanse octrooischriften 3.922.194, 3.959.076 of 3.963.574. In plaats daarvan kan de afgefiltreerde fermentatiebouillon worden gebruikt als een geschikte reactie-oplossing voor de reductie van 2,5-diketogluconzuur tot een 2-ketogulonzuur bevattende oplossing door reactie met een alkalimetaalboorhydride, zoals beschreven in Amerikaans octrooischrift 4.159.990. Het bij deze reacties gevormde 2-ketogulonzuur wordt gemakkelijk omgezet in ascorbinezuur volgens op zichzelf bekende methoden, bijvoorbeeld door de methylester ervan in aanwezigheid van een base te verhitten.

De onderstaande voorbeelden dienen ter nadere toelichting van de uitvinding.

Voorbeeld I

Het onderstaande waterige entmedium werd bereid:

	<u>Bestanddeel</u>	<u>g/l</u>
	Glucose monohydraat	25
30	Maïsweekvloeistof	5
	KH_2PO_4	0,5
	K_2HPO_4	0,5
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
	CaCO_3	7,0
35	pH 6,2	

Een schudkolf, die 1 l medium bevatte, werd 30 min. in een autoclaaf op 121° C verhit. Cellen van Acetobacter cerinus IFO 3263 uit een voedingsagar-schijf (5 ml van een 20 ml steriele waterige suspensie) werden aan de kolf toegevoegd, die
 5 daarna op een roterende schudeend gedurende 24 uur bij 28° C werd geschud. De pH van het afgekoelde medium bedroeg 5,0.

Een monster van de kweekgroei, voldoende om een 10 vol.-%-ige inoculum te verschaffen werd toegevoegd aan een 4 l geroerde fermentator die 2 l bevat van het volgende produktiemedium:

10	<u>Bestanddeel</u>	
	Glucose monohydraat	225 g/l
	Maisweekvloeistof	0,5 g/l
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 g/l
	KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
15	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
	Ureum	1,0 g/l
	Cholinechloride	100 mg/l
	Nicotinezuur	10 mg/l
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,0 mg/l
20	P-2000 Antischuim	1,0 mg/l

pH 6,0

De fermentatie werd uitgevoerd bij 28° C onder roeren met een snelheid van 1700 rpm en beluchten met een snelheid van 1,0 vol. per vol. bouillon per minuut. De pH werd op 5,5 gehouden
 25 door toevoegen van een 20 %-ige natriumhydroxyde-oplossing naar behoefte. 2,5-Diketogluconzuur werd als natriumzout verkregen in een opbrengst van 95 % na een fermentatieduur van 48 uur.

Voorbeeld II

Het volgende waterige inoculummedium werd bereid:

30	<u>Bestanddeel</u>	<u>g/l</u>
	Glucose monohydraat	25
	Maisweekvloeistof	5
	KH ₂ PO ₄	0,5
	K ₂ HPO ₄	0,5
35	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
	CaCO ₃	7,0

8004677

Een schudkolf, die 1 l medium bevatte, werd 30 min. in een autoclaaf op 121°C verhit. Cellen van Acetobacter cerinus IFO 3263 uit een voedingsagar-schijf (5 ml van een 20 ml steriele waterige suspensie) werden aan de kolf toegevoegd, die
 5 daarna op een roterende schudeend gedurende 24 uur bij 28°C werd geschud. De pH van het afgekoelde medium bedroeg 5,0.

Een monster van de kweekgroei, voldoende om een 10 vol.-%ig inoculum te verschaffen, werd toegevoegd aan een 4 l geroerde fermentator die 2 l bevatte van het onderstaande medium:

10	<u>Tweede trap inoculum</u>	<u>g/l</u>
	Glucose monohydraat	100
	MaïswEEKVloeistof	0,5
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5
	KH_2PO_4	1,5
15	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	Ureum	1,0
	Nicotinezuur	10 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
	Cholinechloride	500 mg
20	P2000	0,5 ml

De tweede trap werd uitgevoerd bij 28°C onder roeren met een snelheid van 1700 rpm en beluchten met een snelheid van 1,0 vol. per vol. bouillon per minuut. De pH werd op 5,5 gehouden door toevoegen van een 20 %-ige natriumhydroxyde-oplossing naar
 25 behoefte.

Na 20 uur werd een monster van de cultuurgroei, voldoende om een 10 vol.-%ig inoculum te verschaffen, toegevoegd aan een 14 l geroerde fermentator die 6 l bevatte van het volgende produktiemedium:

30	<u>Bestanddeel</u>	<u>g/l</u>
	Glucose monohydraat	334
	MaïswEEKVloeistof	0,5
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,58
	KH_2PO_4	1,5
35	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5

	<u>Bestanddeel</u>	<u>g/l</u>
	ureum	1,0
	Nicotinezuur	10,0 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
5	Cholinechloride	150 mg
	P2000	0,5 ml

De fermentatie werd uitgevoerd bij 28° C onder roeren met een snelheid van 750 rpm en beluchten met een snelheid van 1,0 vol. per vol. bouillon per minuut. De pH werd op 5,5 gehouden door toevoegen van 20 %-ige natriumhydroxyde-oplossing naar behoefte. 2,5-Diketogluconzuur werd als het natriumzout verkregen in een opbrengst van 95 % na een fermentatieduur van 65-70 uur.

Voorbeeld III

Overeenkomstig de methode van voorbeeld I werden 15 Acetobacter cerinus stammen IFO 3262, 3264, 3265, 3266, 3267, 3268 en 3269 ieder afzonderlijk onderzocht. In elk van de gevallen bevatte het fermentatieprodukt 2,5-diketogluconzuur in een opbrengst van meer dan 50 %, tezamen met wat onomgezet 2-ketogluconzuur en 5-ketogluconzuur tussenprodukt. Hogere opbrengsten van het gewenste 20 2,5-diketogluconzuur kunnen worden verkregen door een langere fermentatieduur toe te passen, wanneer deze stammen van Acetobacter cerinus worden gebruikt.

25

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor de bereiding van 2,5-diketo-
gluconzuur, met het kenmerk, dat men Acetobacter cerinus aeroob
kweekt in een fermentatiemedium dat D-glucose bevat in een oorspron-
5 kelijke concentratie van meer dan 20 gew.% tot 30 gew.% en choline
in een hoeveelheid van tenminste 0,04 gew.%, betrokken op de oor-
spronkelijke hoeveelheid D-glucose in het medium.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk,
dat men een oorspronkelijke concentratie aan D-glucose gebruikt van
10 25-30 gew.%.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het
kenmerk, dat men in het medium choline opneemt in een hoeveelheid
van 0,04-0,1 gew.%.

4. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaan-
15 de conclusies, met het kenmerk, dat men het kweken uitvoert bij een
temperatuur van 25-30° C.

5. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaan-
de conclusies, met het kenmerk, dat men het kweken uitvoert bij een
pH van 5-6.

20 6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk,
dat men de pH handhaaft door toevoegen van natriumhydroxyde.

7. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaan-
de conclusies, met het kenmerk, dat men een medium gebruikt dat
choline bevat in een hoeveelheid van 0,04-0,1 gew.%, het kweken
25 uitvoert bij een temperatuur van 25-30° C en een pH van 5-6.

8. Werkwijze volgens conclusie 1 of 7, met het
kenmerk, dat men als Acetobacter cerinus gebruikt de stam IFO 3263.

9. Werkwijze volgens conclusie 1 of 7, met het
kenmerk, dat men als Acetobacter cerinus gebruikt de stam IFO 3266.

30 10. Werkwijze voor de bereiding van 2,5-diketo-
gluconzuur, zoals hierin beschreven.