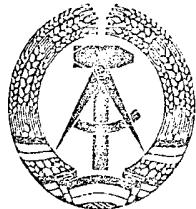


(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

0153 131

Int.Cl.3

3(51) C 12 P 7/58

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP.C 12 P/ 224 153
(31) 079.665;139.036

(22) 26.09.80
(32) 28.09.79;10.04.80

(44) 23.12.81
(33) US;US

(71) PFITZER INC.; NEW YORK, US
(72) KITA, DONALD A.;FENTON, DENNIS M.;US;
(73) PFITZER INC.; NEW YORK, US
(74) INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN, 1020 BERLIN, WALLSTR. 23/24

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON 2,5 -DIKETOGLUCONSAEURE

(57) Verfahren zur Herstellung von 2,5 - Diketogluconsaeure durch aerobe Vermehrung von Acetobacter cerinus in einem Fermentationsmedium, das ueber etwa 20 und bis zu etwa 30 % (Gewicht/Volumen) Glucose und wenigstens etwa 0,04 Gew. - % Cholin, bezogen auf die Menge der Glucose in dem Medium, enthaelt.

Berlin, den 3. 3. 1981
AP C07C/224 153
58 118/18

Verfahren zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure, die als Zwischenstufe zur Herstellung von Ascorbinsäure oder von Comensäure (5-Hydroxy-4-pyron-2-carbonsäure) brauchbar ist.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine Lösung von 2,5-Diketogluconsäure kann selektiv zu 2-Ketogulonsäure reduziert werden, die in Ascorbinsäure umgewandelt werden kann. Die Reduktion von 2,5-Diketogluconsäure kann durch Reduzieren mit einem Alkalimetallborhydrid erfolgen, wie in der US-PS 4 159 990 offenbart, oder durch eine fermentative Reduktion, wie z. B. in der US-PS 3 992 194, 3 959 076 und 3 963 574 beschrieben.

2,5-Diketogluconsäure ist auch als Zwischenstufe zur Herstellung von Comensäure (5-Hydroxy-4-pyron-2-carbonsäure) durch Erwärmen in Gegenwart einer Säure, wie z. B. in der US-PS 3 654 316 beschrieben, brauchbar.

Bislang ist 2,5-Diketogluconsäure von mehreren verschiedenen Bakterien erzeugt worden, wie von *Acetobacter melanogenum*, *Acetobacter aurantium*, *Gluconoacetonbacter rubiginosus*, *Gluconoacetobacter liquifaciens* und *Pseudomonas sesami*. Die Verwendung dieser Mikroorganismen ist jedoch unter industriellem Gesichtspunkt auf Grund verhältnismäßig niedriger Ausbeuten an 2,5-Diketogluconsäure, relativ langer Fertilitationszeiten und wegen der Bildung großer Mengen brauner

58 118/18

- 2 - 224153

oder gelbbrauner Pigmente als Nebenprodukte der Kultivierung, wobei die Reinheit der gewünschten 2,5-Diketogluconsäure herabgesetzt wird, nicht befriedigend.

Die US-PS 3 790 444 bezieht sich auf die Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure ohne begleitendes braunes Pigment durch eine neue Art, die als Acetobacter fragum ATCC Nr. 21 409 bezeichnet wird.

Die USSN 79 668 (vom 28. 9. 1979) bezieht sich auf die Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure in guten Ausbeuten ohne die Bildung pigmentierten Materials durch aerobe Vermehrung von Acetobacter cerinus in einem glucosehaltigen Medium. Während Glucose-Gesamtmengen von etwa 2,5 bis etwa 20 % (Gewicht/Volumen) verwendet werden können, wurde gefunden, daß Glucose-Anfangskonzentrationen im Medium von mehr als 15 % von den Mikroorganismen nicht verkraftet werden können. Demnach können Glucose-Gesamtmengen von mehr als etwa 15 % (Gewicht/Volumen) nur eingesetzt werden, indem die Fermentation mit einer Glucose-Anfangskonzentration von etwa 10 bis 15 % (Gewicht/Volumen) durchgeführt und danach weitere Glucose-Teilmengen dem Fermentationsmedium während des Fermentationsverlaufs zugesetzt werden, wobei die Glucose-Konzentration im Medium zu jeder gegebenen Zeit etwa 15 % (Gewicht/Volumen) nicht überschreitet. Daher waren bislang die Gesamtkonzentrationen oder Produktionskapazitäten an 2,5-Diketogluconsäure durch die verhältnismäßig niedrige Glucose-Anfangskonzentration, die im Fermentationsmedium eingesetzt werden kann, beschränkt. Die Produktivität von Verfahren, die andere Mikroorganismen zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure einsetzen, wie oben beschrieben, ist auch durch die Notwendigkeit der Verwendung verhältnismäßig niedriger Glucose-Anfangskonzentrationen im Fermentationsmedium beschränkt.

58 118/18

- 3 -

224153

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure, mit dem gute Ausbeuten ohne Bildung wesentlicher Mengen pigmentierter Materialien in verhältnismäßig kurzen Fermentationszeiten erreicht werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, derart zu verfahren, daß Glucose-Anfangskonzentrationen über etwa 15 % (Gewicht/Volumen), insbesondere Werte über 20 % toleriert werden können und von den Mikroorganismen zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure verwertet werden.

Erfindungsgemäß wurde nun gefunden, daß Glucose-Anfangskonzentrationen über 20 % und bis zu etwa 30 % (Gewicht/Volumen) in einem Fermentationsmedium von dem Mikroorganismus *Acetobacter cerinus* zur Erzeugung von 2,5-Diketogluconsäure verwertet werden können, wenn wenigstens etwa 0,04 Gew.-% Cholin, bezogen auf die Menge an D-Glucose im Medium, dem Fermentationsmedium zugesetzt werden. Insbesondere führt die Erfindung zu einem Verfahren zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure in hohen Konzentrationen im Fermentationsmedium durch aerobe Vermehrung von *Acetobacter cerinus* in einem Fermentationsmedium, das D-Glucose in einer Anfangskonzentration über etwa 20 und bis zu etwa 30 % (Gewicht/Volumen) sowie Cholin in einer Menge von wenigstens etwa 0,04 Gew.-%, bezogen auf die D-Glucose-Menge im Medium, enthält. Die Glucose-Anfangskonzentration im Fermentationsmedium ist vorzugsweise etwa 25 bis 30 % (Gewicht/Volumen). Die Vermehrung erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur von 25 bis 30 °C, bevorzugt bei einem pH von etwa 5 bis 6. Bevorzugte Stämme sind *Acetobacter cerinus* oder *Acetobacter cerinus* IFO 3263 und IFO 3266.

So ist leicht erkennbar, daß ein Verfahren, bei dem Glucose-Anfangskonzentrationen über etwa 15 % (Gewicht/Volumen), insbesondere Werte über 20 % toleriert werden können und von den Mikroorganismen zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure verwertet werden, eine erhebliche Steigerung der Produktionskapazität schafft und das Arbeiten sehr wirtschaftlich macht. Ein solches Verfahren vermeidet auch die Möglichkeit einer Verunreinigung des Fermentationsmediums, die eintreten kann, wenn die Produktionskapazitäten durch Zusatz weiterer Glucosemengen während des Fermentationsverlaufs gesteigert werden.

2,5-Diketogluconsäure wird im erfindungsgemäßen Verfahren in guten Ausbeuten ohne Bildung wesentlicher Mengen pigmentier-

5

58 118/18

-30-

224153

ter Materialien in verhältnismäßig kurzen Fermentationszei-
ten hergestellt. Eine Reihe von Stämmen von Acetobacter

- 6 - 224153

cerinus, einschließlich IFO 3262 (ATCC 12303), IFO 3263, IFO 3264, IFO 3265, IFO 3266, IFO 3267, IFO 3268 und IFO 3269 sind der Öffentlichkeit zugänglich und können beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Stämme sind IFO 3263 und IFO 3266. Natürlich sind auch Mutanten dieser Mikroorganismen, hergestellt nach herkömmlichen Methoden, z.B. durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder UV-Licht, Behandeln mit Stickstoffflossten oder dgl., beim erfindungsgemäßen Verfahren brauchbar und von der Erfindung umfaßt.

Acetobacter cerinus wird in einem Medium kultiviert, dessen Hauptkohlenstoffquelle D-Glucose ist. Natürlich enthält in Übereinstimmung mit herkömmlicher Fermentationspraxis das Fermentationsmedium auch Stickstoff-, Kalium-, Phosphor- und Magnesiumquellen. Der Begriff "Fermentationsmedium", wie er hier verwendet wird, soll ein solche Verbindungen enthaltendes Medium definieren. Wird Acetobacter cerinus als Mikroorganismus beim erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt, ist es nicht notwendig, kostspielige organische Stickstoffquellen, wie Pepton oder Fleischextrakt, zu verwenden. Der Stickstoff kann in wirtschaftlicher Weise durch die Verwendung von Harnstoff oder anorganischen Stickstoffquellen, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Ammoniumphosphat oder ähnlichen Salzen, im allgemeinen in Mengen zwischen etwa 0,1 und 2 g/l Fermentationsmedium, zur Verfügung gestellt werden, wenn auch Nicotinsäure als Wachstumsfaktor zugesetzt wird, im allgemeinen in einer Menge von etwa 0,2 bis 10 mg/l Fermentationsmedium. Kalium, Magnesium und Phosphor werden leicht durch Zusatz von Salzen, wie Kaliumphosphat, Ammoniumphosphat, Magnesiumsulfat oder ähnlichen Salzen, im allgemeinen in Mengen von etwa 0,1 bis etwa 1 g/l Fermentationsmedium, zur Verfügung gestellt. Bei der Zusammenstellung des Fermentationsmediums ist jedoch erhebliche Variation möglich.

Andere geeignete Medien liegen für den Fachmann auf der Hand, und das erfindungsgemäße Verfahren soll nicht auf die Verwendung der oben und in den Beispielen beschriebenen besonderen Medien beschränkt sein. Beim erfindungsgemäßen Verfahren enthält das Fermentationsmedium D-Glucose in Anfangskonzentrationen über den bisher möglichen ohne schädlichen Einfluß auf die bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen. Speziell liegt die D-Glucose-Anfangskonzentration in dem beim erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Fermentationsmedium im Bereich über etwa 20 und bis zu etwa 30 % (Gewicht/Volumen), insbesondere zwischen etwa 25 und 30 % (Gewicht/Volumen). Wenn gewünscht, kann D-Glucose als Cerelose (D-Glucose-Monohydrat) zugesetzt werden.

Damit die Acetobacter cerinus-Mikroorganismen so hohe Glucosekonzentrationen im Fermentationsmedium zu ertragen und zu verwerten vermögen, muß dem Fermentationsmedium Cholin in einer Menge von wenigstens 0,04 Gew.-%, bezogen auf die Anfangsmenge an D-Glucose in dem Fermentationsmedium, zugesetzt werden. Wenn gewünscht, können verhältnismäßig hohe Cholinmengen, z.B. etwa 0,5 Gew.-%, bezogen auf die D-Glucose-Anfangskonzentration im Fermentationsmedium, verwendet werden, wenngleich sich wenig Vorteil bei der Verwendung von mehr als etwa 0,1 Gew.-% Cholin ergibt, und etwa 0,04 bis 0,06 Gew.-% Cholin sind im allgemeinen bevorzugt. Cholin kann entweder als freie Base oder als Salz, z.B. als Cholinchlorid, Cholinbicarbonat, Cholincitrat, Cholinglukonat oder ähnliche Salze, zugesetzt werden. Cholinchlorid ist ein bevorzugtes Salz. Die Konzentration an Cholin, wie hier definiert, ist als Cholin-Base berechnet. Ein kleiner Teil des nötigen Cholins kann, wenn gewünscht, durch Zugabe von Maisquellflüssigkeit zum Fermentationsmedium beigesteuert werden. Maisquellflüssigkeit, die in Fermentationsmedien als Quelle für Vitamine und Mineralstoffe verwendet wird, enthält im allgemeinen nur etwa 0,5 bis 3 mg Cholin/g Maisquellflüssigkeit. Doch werden gewöhnlich nicht mehr als etwa 5 g Maisquellflüssigkeit pro 1 Fermentationsmedium einge-

setzt, da Maisquellflüssigkeit Farbkörper enthält und die Zugabe von mehr als etwa 5 g Maisquellflüssigkeit pro 1 Fermentationsmedium die Gewinnung und Reinigung der 2,5-Diketogluconsäure schwieriger macht. Daher kann Maisquellflüssigkeit, wenn gewünscht, nur als Quelle für einen kleinen Teil des für die Fermentation nötigen Cholins verwendet werden, und der Rest der erforderlichen Cholinmenge wird dem Fermentationsmedium als Cholinbase oder als Salz, wie oben beschrieben, zugesetzt.

Die Fermentation erfolgt im allgemeinen bei einer Temperatur von etwa 20 bis 35°C, vorzugsweise zwischen 25 und 30°C, insbesondere bevorzugt um 28°C. Der Anfangs-pH eines Kulturmediums liegt im Bereich von etwa 3,5 bis 7,5, bevorzugt zwischen etwa 5 und 6. Im Verlauf der Fermentation wird der pH wunschgemäß in diesem Bereich, vorzugsweise bei etwa 5,5, z.B. durch Zugabe eines Alkalimetallhydroxids, vorzugsweise einer Natronlauge, gehalten. Alternativ kann ein Alkalimetall- oder Erdalkalimetallcarbonat, vorzugsweise Calciumcarbonat, zur pH-Steuerung verwendet werden und wird für diesen Zweck in ergänzendem Medium nach der Autoklavestufe in ausreichender Menge zugegeben, um zum gewünschten pH zu führen, im allgemeinen zwischen 20 und 30 g/100 g Glucose. Es versteht sich, daß die 2,5-Diketogluconsäure in solchen Fermentationsmedien in Form der entsprechenden Alkali- oder Erdalkalimetallsalze, wie der Natrium- oder Calciumsalze, anfällt und daß solche Salze von dem Begriff "2,5-Diketogluconsäure" im vorliegenden Zusammenhang umfaßt sind.

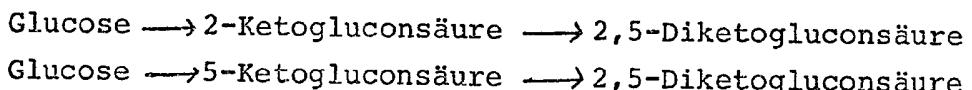
Nach dem Beimpfen wird das Fermentationsmedium gerührt, z.B. mit einem mechanischen Rührer, und belüftet, bevorzugt mit einer Geschwindigkeit von 0,5 bis 1 Volumen Luft pro Volumen Fermentationsbrühe pro min. Wenn gewünscht, kann weitere Glucose während der Fermentation zugesetzt werden, um einen Teil der bei der Fermentation verbrauchten Glucose zu ersetzen, wodurch die Gesamtkonzentration an in der Fermenta-

9
- 7 - 224153

tionsbrühe erhaltener 2,5-Diketogluconsäure gesteigert wird.

Die Fermentation wird fortgesetzt, bis die gewünschte Ausbeute erreicht ist. Beispielsweise bringt unter Verwendung von Acetobacter cerinus IFO 3263 oder 3266 eine Fermentationszeit von etwa 40 bis 50 h eine Ausbeute von etwa 90 bis 95 % 2,5-Diketogluconsäure, bezogen auf D-Glucose. Eine gewisse Variation der Reaktionszeiten und Ausbeuten ist jedoch in Abhängigkeit vom besonderen Mikroorganismen-Stamm, der Glucosekonzentration im Fermentationsmedium und der Kultivierungstemperatur zu erwarten.

Ohne an den folgenden Mechanismus gebunden sein zu wollen, wird angenommen, daß die Umwandlung von Glucose in 2,5-Diketogluconsäure auf folgendem Wege abläuft:



Die Zwischenstufen der 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure und die 2,5-Diketogluconsäure können papierchromatographisch mit einem Whatman Nr. 1 und Nr. 4-Papier und einem Lösungsmittelsystem aus Methyläthylketon/Aceton/Ameisensäure/Wasser (80:6:2:12) getrennt werden. Die Säureflecke werden durch Sprühen einer 0,2%igen äthanolischen o-Phenyldiamin-Lösung mit 1 % Salpetersäure und Erwärmen auf etwa 70°C (5-Ketogluconsäure: blau; 2-Ketogluconsäure: gelb; 2,5-Diketogluconsäure: grün) lokalisiert. Auch Hochdruckflüssigkeitschromatographie kann angewandt werden. Mit den obigen Methoden kann das Fortschreiten der Fermentation verfolgt werden.

2,5-Diketogluconsäure kann von der fertigen Fermentationsbrühe nach irgendeiner der dem Fachmann bekannten herkömmlichen Arbeitsweisen abgetrennt und gewonnen werden. Bei-

10 58 118/18

- § - 224153

spielsweise kann die Fermentationsbrühe filtriert, der pH des wäßrigen Filtrats durch Zugabe einer Mineralsäure, wie Salzsäure, auf 2 bis 2,5 eingestellt, dann die Lösung eingeengt und ein niederer Alkylalkohol, vorzugsweise Äthanol oder Methanol, zugesetzt werden. Beim Stehen scheidet sich die 2,5-Diketogluconsäure in Form ihres Calcium- oder Natriumsalzes als Feststoff aus der Lösung ab. Die 2,5-Diketogluconsäure kann aus dem Salz durch Behandeln mit einer verdünnten Mineralsäure und anschließend beispielsweise durch Behandeln mit einem Kationenaustauscherharz, wie einem Sulfonsäureharz, z. B. Dowex 50, erhalten werden.

Wenn gewünscht, kann die Fermentationsbrühe weiter bearbeitet werden, um die gebildete 2,5-Diketogluconsäure in andere gewünschte Produkte umzuwandeln, z. B. durch fermentative Reduktion zu 2-Ketogulonsäure, wie in den US-PS'en 3 992 194, 3 959 076 oder 3 963 574 beschrieben. Alternativ kann die filtrierte Fermentationsbrühe als geeignete Reaktionslösung für die Reduktion von 2,5-Diketogluconsäure zu einer 2-Ketogulonsäure enthaltenden Lösung durch Umsetzen mit einem Alkalimetallborhydrid verwendet werden, wie in der US-PS 4 159 990 beschrieben. Die bei diesen Umsetzungen erzeugte 2-Ketogulonsäure wird nach auf dem Fachgebiet bekannten Maßnahmen leicht in Ascorbinsäure umgewandelt, z. B. durch Erwärmen des Methylesters in Gegenwart einer Base.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, es versteht sich jedoch, daß sie nicht auf die speziellen Einzelheiten dieser Beispiele beschränkt ist.

- 11 - 224153

Beispiel 1

Das folgende wässrige Impfmedium wurde hergestellt:

<u>Bestandteil</u>	<u>g/l</u>
Glucose-Monohydrat	25
Maisquellflüssigkeit	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
pH	6,2

Ein Schüttelkolben mit 1 l Medium wurde 30 min bei 121°C im Autoklaven behandelt. Zellen von *Acetobacter cerinus* IFO 3263 aus einer Nähragar-Schrägkultur (5 ml einer sterilen, wässrigen 20 ml-Suspension) wurden in den Kolben gegeben, der dann auf einem Rotationsschüttler bei etwa 28°C 24 h geschüttelt wurde. Der pH des gekühlten Mediums war 5,0.

Eine Teilmenge der gewachsenen Kultur, ausreichend für ein 10 vol/vol.-%iges Inokulum, wurde in einen gerührten 4 l-Fermentator gegeben, der 2 l des folgenden Produktionsmediums enthielt:

<u>Bestandteil</u>	
Glucose-Monohydrat	225 g/l
Maisquellflüssigkeit	0,5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5 g/l
KH_2PO_4	1,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
Harnstoff	1,0 g/l
Cholinchlorid	100 mg/l
Nicotinsäure	10 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg/l
Antischaummittel (P-2000)	1,0 mg/l
pH	6,0

- 12 - 224153

Die Fermentation erfolgte bei 28°C unter Rühren bei 1700 U/min und Belüften mit einer Geschwindigkeit von 1,0 Volumen pro Volumen Brühe pro min. Durch Zusatz einer 20%igen Natronlauge nach Bedarf wurde der pH bei 5,5 gehalten. 2,5-Diketogluconsäure als Natriumsalz wurde in einer Ausbeute von 95 % nach einer Fermentationszeit von 48 h erhalten.

Beispiel 2

Das folgende wässrige Impfmedium wurde hergestellt:

<u>Bestandteil</u>	<u>g/l</u>
Glucose-Monohydrat	25
Maisquellflüssigkeit	5
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
CaCO ₃	7,0

Ein Schüttelkolben mit 1 l Medium wurde 30 min bei 121°C autoklavenbehandelt. Zellen von *Acetobacter cerinus* IFO 3263 aus einer Nähragar-Schrägkultur (5 ml einer sterilen, wässrigen 20 ml-Suspension) wurden in den Kolben gegeben, der dann auf einem Rotationsschüttler bei etwa 28°C etwa 24 h geschüttelt wurde. Der pH des gekühlten Mediums war 5,0.

Eine Teilmenge der gewachsenen Kultur, ausreichend für ein 10 vol.-/vol.-%iges Inokulum wurde in einen gerührten 4 l-Fermentator gegeben, der 2 l des folgenden Mediums enthielt:

<u>Inokulum zweiter Stufe</u>	<u>g/l</u>
Glucose-Monohydrat	100
Maisquellflüssigkeit	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5
KH_2PO_4	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Harnstoff	1,0
Nicotinsäure	10 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
Cholinchlorid	500 mg
Antischaummittel (P2000)	0,5 ml

Die zweite Stufe wurde unter Rühren bei 1700 U/min und 28°C sowie unter Belüften mit einer Geschwindigkeit von 1,0 Volumen pro Volumen pro min durchgeführt. Der pH wurde durch Zugabe einer 20%igen Natronlauge nach Bedarf bei 5,5 gehalten.

Nach 20 h wurde eine Teilmenge der gewachsenen Kultur, ausreichend für ein 10 vol.-/vol.-%iges Inokulum, in einen gerührten 14 l-Fermentator gebracht, der 6 l des folgenden Produktionsmediums enthielt:

<u>Bestandteil</u>	<u>g/l</u>
Glucose-Monohydrat	334
Maisquellflüssigkeit	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,58
KH_2PO_4	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Harnstoff	1,0
Nicotinsäure	10,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
Cholinchlorid	150 mg
Antischaummittel (P2000)	0,5 ml

- 2 - 224153

Die Fermentation wurde unter Röhren bei 750 U/min, 28°C und Belüften mit einer Geschwindigkeit von 1,0 Volumen pro Volumen pro min durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe einer 20%igen Natronlauge nach Bedarf bei 5,5 gehalten. 2,5-Diketogluconsäure wurde als Natriumsalz in einer Ausbeute von 95 % nach einer Fermentationszeit von 6570 h erhalten.

Beispiel 3

Nach der Arbeitsweise des Beispiels 1 wurden jeweils *Acetobacter cerinus*-Stämme IFO 3262, 3264, 3265, 3266, 3267, 3268 und 3269 getestet. In jedem Falle enthielt das Fermentationsprodukt 2,5-Diketogluconsäure in mehr als 50 % Ausbeute, zusammen mit etwas nicht umgewandelter 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure als Zwischenstufen. Höhere Ausbeuten der gewünschten 2,5-Diketogluconsäure können unter Anwendung längerer Fermentationszeiten erhalten werden, wenn diese Stämme von *Acetobacter cerinus* eingesetzt werden.

15
- 13 - 58 118/18
224153

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von 2,5-Diketogluconsäure, gekennzeichnet dadurch, daß Acetobacter cerinus in einem Permentationsmedium, das D-Glucose in einer Anfangskonzentration von über etwa 20 % und bis zu etwa 30 % (Gewicht/Volumen) sowie Cholin in einer Menge von wenigstens etwa 0,04 Gew.-%, bezogen auf die Anfangsmenge an D-Glucose in dem Medium, enthält, aerob vermehrt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß bei einer Anfangskonzentration an D-Glucose von etwa 25 bis 30 % (Gewicht/Volumen) gearbeitet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß es in einem Medium, das Cholin in einer Menge zwischen etwa 0,04 und 0,1 Gew.-% enthält, durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß die Vermehrung bei einer Temperatur zwischen etwa 25 und 30 °C erfolgt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß die Vermehrung bei einem pH von etwa 5 bis 6 erfolgt.
6. Verfahren nach Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß der pH durch Zugabe von Natriumhydroxid aufrechterhalten wird.
7. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß es in einem Medium, das Cholin in einer Menge zwischen etwa 0,04 und 0,1 Gew.-% enthält, durchgeführt wird und die Vermehrung bei einer Temperatur zwischen etwa 25 und 30 °C und einem pH-Wert von etwa 5 bis 6 erfolgt.

58.118/18
- 44 - 224153

8. Verfahren nach Punkt 1 oder 7, gekennzeichnet dadurch,
daß es mit dem Acetobacter cerinus-Stamm IFO 3263 durch-
geführt wird.
9. Verfahren nach Punkt 1 oder 7, gekennzeichnet dadurch,
daß es mit dem Acetobacter cerinus-Stamm IFO 3266 durch-
geführt wird.