

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 782871 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **782871**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
C12D 0/

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.09.1978**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.09.1978**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **19.05.1979**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

18.11.1977 US 85295077

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • PFIZER INC, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • KITA DONALD ALBERT, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • HALL KARLENE ELIZABETH, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Förfarande för framställning av 2,5-diketoglukonsyra

Pfizer, Inc., 235 East 42nd Street,
New York, N.Y., Yhdysvallat

vitamiine (ei alusta)

Menetelmä 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av 2,5-diketoglukonsyra

Tämä keksintö koskee 2,5-diketoglukonihapon valmistusta.

2,5-diketoglukonihappo on C-vitamiinisynteesin käyttökelpoinen välituote. Tähän saakka 2,5-diketoglukonihappoa on valmistettu useiden erilaisten bakteerilajien kuten *Acetobacter melanogenum*, *Acetobacter aurantium*, *Gluconoacetobacter rubiginosus*, *Gluconoacetobacter liquefaciens* ja *Pseudomonas sesami* avulla. Mutta näiden ^{mikro-organismien} pieneliöiden käyttö ei ole täysin toivottavaa teolliselta näkökannalta, koska viljelyssä syntyy sivutuotteina suuria määriä ruskeita tai keltaisenruskeita pigmenttejä, jotka alentavat samalla syntyneen 2,5-diketoglukonihapon puhtautta.

US-patentissa 3 790 444 on vaadittu patenttia 2,5-diketoglukonihapon valmistukselle ilman siihen liittyvää ruskeata pigmenttiä uuden lajin avulla merkinnällä *Acetobacter fragum*.

Tämä keksintö koskee taloudellista menetelmää 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi käyttäen helposti saatavia, julkisesti säily-

tettyjä *Acetobacter cerinus*-kantoja. Kaksi näistä kannoista, IFO 3263 ja 3266, tuottaa 2,5-diketoglukonihappoa ^{noilla}saantoina yli 95 % (glukoosista laskettuna).

2,5-diketoglukonihappo on askorbiinihappovalmistuksen käyttökelpoinen välituote. 2,5-diketoglukonihapon vesiliuos voidaan selektiivisesti pelkistää 2-ketogulonaatin ja 2-ketoglukonaatin seokseksi, joka voidaan muuttaa askorbiini- ja erytorbiinihapoksi.

2,5-diketoglukonihappo on helposti valmistettavissa bakteerien vaikuttaessa glukoosiin käyttäen käsiteltävänä olevan keksinnön menetelmän mukaan *Acetobacter cerinus*ksen helposti saatavia kantoja. Kaikki *Acetobacter cerinus*ksen luetteloidut, julkisesti säilytetyt kannat on tässä tutkimuksessa testattu ja osoitettu tuottavan ketohappoja ^{noilla}saantoina 50-95 % (glukoosista laskettuna). Käytettäessä kantoja *Acetobacter cerinus* IFO 3263 ja 3266 ^{saatavissa}tuotettuna ketohappona ~~on~~ yksinomaan haluttu 2,5-diketoglukonihappo ^{saantoina}saantoina yli 95 % (glukoosista laskettuna). Saatavissa olevat, julkisesti säilytetyt *Acetobacter cerinus*-kannat ovat:

IFO 3262 (ATCC 12303)
 3263
 3264
 3265
 3266
 3267
 3268
 3269

Näitä *Acetobacter cerinus*-kantoja viljellään alustassa, jonka päähiililähteenä on glukoosi. Nämä pieneliöt eivät tarvitse kallista orgaanisia typpilähteitä kuten peptonia ja lihauutetta. Käytettäessä ureaa ja epäorgaanisia typpilähteitä kuten ammoniumsulfaattia, ammoniumnitraattia ja ammoniumfosfaattia lisätään nikotiinihappoa välttämättömänä kasvutekijänä.

Viljelyalustan glukoosikonsentraatio on 2,5-20 %, mieluiten 10-12 % 2,5-diketoglukonihapon saamiseksi taloudellissimmin. Fermentointilämpötila on 20 - 35°C, mieluummin 25 - 30°C ja erityisesti n. 28°C. Viljelyalustan lähtö-pH voi olla 3,5-7,5 ja erityisesti 5-6. Fermentoinnin aikana pH pidetään arvossa n. 5,5 lisäämällä natriumhydroksidiliuosta. pH-säädössä voidaan käyttää kal-

siumkarbonaattia, jota lisätään viljelyalustan kokonaismäärään autoklavoinnin jälkeen 30 g/110 g glukoosia.

^{Ympäristö}
Tartuttamisen jälkeen fermentointialustaa sekoitetaan mekaanisella sekoittimella n. 1700 kierr./min ja ilmastetaan suhteessa 0,5 - 1 tilavuusosaa ilmaa/tilavuusosa ravinneliuosta/minuutti.

Käytettäessä Acetobacter cerinus-kantaa IFO 3263 tai 3266 fermentointia jatketaan kunnes 2,5-diketoglukonihapon saanto on vähintään 90 % (glukoosista laskettuna, 36-40 tuntia).

aihe

Osoitettiin paperikromatografisesti että glukoosi muuttuu 2,5-diketoglukonihapoksi seuraavasti:

glukoosi $\longrightarrow$ 2-ketoglukonihappo $\longrightarrow$ 2,5-diketoglukonihappo

glukoosi $\longrightarrow$ 5-ketoglukonihappo $\longrightarrow$ 2,5-diketoglukonihappo

Käytettiin Whatman-papereita n:o 1 ja 4 ja liuotinsysteemiä metyylietyyliketoni: asetoni : muurahaishappo : vesi (80:6:2:12). Happotäplät tunnistettiin suihkuttamalla 0,2 %:lla o-fenyleenidiamiini-etanoliliuoksella, jossa oli 1 % typpihappoa ja kuumentamalla n. 70°C:een (5-ketoglukonihappo = sininen, 2-ketoglukonihappo = keltainen ja 2,5-diketoglukonihappo = vihreä). Tunnistamisessa voidaan myös käyttää korkeapainestekromatografiaa.

Esimerkki
2,5-diketoglukonihappo voidaan erottaa ja ottaa talteen lopullisesta fermentointiravinneliuoksesta asiantuntijoiden tuntemin tavanomaisin menetelmin. Suodatettua fermentointiravinneliuosta voidaan työstää esim. käsittelemällä borohydridillä ja muodostunut 2-ketoglukonihapon ja 2-ketoglukonihapon seos hydrolysoida askorbiini- ja erytrobiinihapoksi.

Esimerkki 1

Valmistettiin seuraava tartuttamisravinneliuos:

<u>Aineosa</u>	<u>g/l</u>
Glukoosia	25
Maissi ^{ruuho} liuotteenestettä	5
KH ₂ PO ₄ :ää	0,5
K ₂ HPO ₄ :ää	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O:ta	0,2
CaCO ₃ :a	6,3
	pH 6,2

Ravistelukulvia, jossa oli 1 litra ravinneliuosta autoklavoitiin 30 minuuttia 121°C:ssa. Jäähdyneen ravinneliuoksen pH oli 5,0. Kolviin lisättiin Acetobacter cerinus IFO 3263:n soluja

agarvinoviljelmästä (5 ml 20 ml:sta steriiliä vesisuspensiota) ja kolvia ravisteltiin pyörivässä ravistimessa n. 28°C:ssa n. 24 tuntia.

2. Viljelmästä otettiin sellainen määräosa, että voitiin siirtää 5 t/t-% ^{ympyriä} ~~istutetta~~ neljän litran sekoitettuun fermentoriin, jossa oli 2 litraa seuraavaa tuotantoviljelyalustaa:

<u>Aineosa</u>	<u>g/l</u>
Glukoosia	110
Maissin ^{liuotus} uut onestettä	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄ :ää	0,58
KH ₂ PO ₄ :ää	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O:ta	0,5
Ureaa	0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O:ta	1 <u>mg</u>
Nikotiinihappoa	300 <u>gammaa</u>
	pH 6,0

Fermentointi suoritettiin lämpötilassa n. 28°C sekoittaen 1700 kierr./min ja ilmastaen suhteessa 0,75 tilavuusosaa ilmaa/tilavuusosa ravinneliuosta/minuutti. Noin 20 tunnin fermentoinnin jälkeen lisättiin 55 g/l steriiliä glukoosia. pH pidettiin arvossa 5,5 lisäämällä natriumhydroksidiliuosta. Fermentointia jatkettiin kunnes 2,5-diketoglukonihapon saanto oli yli 95 % (glukoosista laskettuna).

Esimerkki 2

^{ei mitään}
^{suoritus} Toistettiin esimerkin 1 menetelmä ja saatiin vastaavia tuloksia Acetobacter cerinus-kannalla IFO 3266.

Patenttivaatimukset

tunnetaan
tekniikasta

1. Menetelmä L-askorbiinihapon valmistuksessa välituotteena käytettävän 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että *Acetobacter cerinus*-kanta viljellään aerobisesti fermentointialustalla, jonka päähiililähde on glukoosi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fermentointialustan glukoosipitoisuus on 2,5-20 %, fermentointilämpötila 20-35°C ja lähtö-pH 3,5-7,5, ja että pH pidetään fermentoinnin aikana arvossa n. 5,5.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Acetobacter cerinus* on kanta IFO 3263.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Acetobacter cerinus* on kanta IFO 3266.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA 3790444 (C12 6 1/00) 3234105 (195-79)

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

29/12-81 Eero Kainio

Allekirjoitus