



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁷: **C 12 P 7/60**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1989 04599**
- (22) Indleveringsdag: **1989-09-18**
- (24) Løbedag: **1989-09-18**
- (41) Alm. tilgængelig: **1990-03-31**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **2001-01-15**
- (30) Prioritet: **1988-09-30 EP 88116156**
- (73) Patenthaver: **F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, CH-4002 Basel, Schweiz**
- (72) Opfinder: **Tatsuo Hoshino, Fueta 808-47, Kamakura-shi, Kanagawa-ken, Japan**
Setsuko Nomura, Mutsuaise 202, Kameino 1015-2, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa-ken, Japan
Teruhide Sugisawa, Kohnandai 8-26-10, Kohnan-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan
- (74) Fuldmægtig: **Plougmann, Vingtoft & Partners A/S, Sankt Annæ Plads 11, 1250 København K, Danmark**
-

- (54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre**
- (56) Fremdragne publikationer:
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8.udg. 1974, side 251-153
EP A 0213591
EP A 0278447
- (57) Sammendrag:
En fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ved fermentativ omdannelse af L-sorbose under anvendelse af et fermenteringssystem bestående af bestanddele, der er produceret af en mikroorganisme, som har de identificerende træk af stamme DSM nr. 4025, samt en gærbestanddel.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ved fermentativ omdannelse af L-sorbose med et højt udbytte.

2-Keto-L-gulonsyre er et vigtigt mellemprodukt ved fremstillingen af
5 L-ascorbinsyre, som den kan omdannes til ved den velkendte Reichstein-metode.

Fermentativ fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra D-sorbitol eller L-sorbose er kendt.

JP 40154/1976 beskriver således fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud
10 fra D-sorbitol ved hjælp af mikroorganismer af slægten *Acetobacter*, *Bacterium* eller *Pseudomonas*, som er i stand til at oxidere D-sorbitol under aerobe betingelser, hvorved der fremstilles 2-keto-L-gulonsyre. Udbyttet ved denne kendte fremgangsmåde er imidlertid temmeligt ringe, nemlig mindre end 6 g/l.

15 Ifølge en anden kendt fremgangsmåde, der er beskrevet i "Acta Microbiologica Sinica" 21(2), 185-191 (1981), kan 2-keto-L-gulonsyre fremstilles ud fra L-sorbose ved hjælp af en blandet mikroorganismekultur, der omfatter *Pseudomonas striata* og *Gluconobacter oxydans*; udbyttet er 30 g/l, når man starter med en koncentration på 70 g/l L-
20 sorbose, og 37 g/l, når man starter med en koncentration på 100 g/l L-sorbose.

Desuden beskriver EP 221 707 fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra L-sorbose ved hjælp af *Pseudogluconobacter saccharoetogenes* med og uden ledsagende bakterier. Imidlertid er udbyttet ved denne kendte
25 fremgangsmåde ved hjælp af *Pseudogluconobacter saccharoetogenes* i sig selv højst 55,3-87,6 g/l (omdannelsesgrad: 34,2-54,1%) (se side 13, tabel 4, i EP 221 707).

EP 278 447 beskriver også en fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ud fra L-sorbose ved hjælp af en blandet mikroorganismekultur, hvoriblandt én har de identificerende træk af DSM nr.
30 4025, og en anden har de identificerende træk af DSM nr. 4026 (en *Bacillus megaterium*-stamme). Selv om den mikroorganisme, der har de

identificerende træk af DSM nr. 4025, især DSM nr. 4025 i sig selv, som sådan i det væsentlige ikke har nogen evne til at vokse og producere 2-keto-L-gulonsyre, vokser den blandede kultur, der som anden bestanddel indeholder en *Bacillus megaterium*-mikroorganisme, faktisk og producerer 2-keto-L-gulonsyre i udbytter på 40 g/l og derover. Således blev tilstedeværelsen af den anden mikroorganismebestanddel (*Bacillus megaterium*) betragtet som værende essentiel for udøvelsen af den fremgangsmåde, der er beskrevet i EP 278 447.

EP 213591 A2 beskriver stammer af *Gluconobacter oxidans*, som i nærværelse af gærekstrakt kan producere 2-keto-L-gulonsyre ved fermentativ omdannelse af L-sorbose. Disse kendte stammer er dog ikke i stand til at producere 2-keto-L-gulonsyre med et udbytte på over 70 g/l.

Den foreliggende opfindelse bygger på den overraskende erkendelse, at det er muligt at fremstille 2-keto-L-gulonsyre ud fra L-sorbose under anvendelse af *Gluconobacter oxidans* stamme DSM nr. 4025, uden samtidig anvendelse af en anden mikroorganisme, dvs. *Bacillus megaterium*.

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ved fermentativ omdannelse af L-sorbose under anvendelse af *Gluconobacter oxidans* stamme DSM nr. 4025, der som sådan i det væsentlige ikke har nogen evne til at vokse og producere 2-keto-L-gulonsyre, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der anvendes en ren kultur af mikroorganismen, og at fermenteringen udføres i nærværelse af gær eller et gærprodukt som mediebestanddel.

Ifølge den foreliggende opfindelse er det muligt at fremstille 2-keto-L-gulonsyre ud fra L-sorbose i et væsentligt forbedret udbytte, nemlig et udbytte på over 72 g/l (omdannelsesgrad: 93,7%), når der startes med en L-sorbosekoncentration på 80 g/l, og endog over 100 g/l (omdannelsesgrad: 92,8%), når der startes med en L-sorbosekoncentration på 100 g/l, og i højere udbytter, når der startes med højere koncentrationer. Omdannelsesgraden beregnes på grundlag af de producerede mængder 2-keto-L-gulonsyre og det forbrugte L-sorbose.

Den mikroorganismestamme, der anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, er *Gluconobacter oxidans* stamme DSM nr. 4025, der som sådan i det væsentlige ingen evne har til at vokse og producere 2-keto-L-gulonsyre. De vigtigste identificerende træk er:

- 5 negativ oxidase-test; ethanol oxideres til eddikesyre; D-glucose oxideres til D-gluconsyre og 2-keto-D-gluconsyre; ketogenese af polyalkoholer; dihydroxyacetone produceres i det væsentlige ikke ud fra glycerol; 2-keto-D-glucarsyre produceres ud fra D-sorbitol og D-glucarsyre, men ikke ud fra D-glucose, D-fructose, D-
10 gluconsyre, D-mannitol eller 2-keto-D-gluconsyre; polymorf, tilsyneladende ingen flageller; brunt pigment produceres ud fra fructose; god vækst ved samdyrkning i nærværelse af *Bacillus megaterium* eller en celleekstrakt deraf; streptomycin-følsom.

- Ifølge den foreliggende opfindelse anvendes en ren kultur af mikroorganismen. Udtrykket "en ren kultur af mikroorganismen" betegner en
15 kultur, som kun indeholder mikroorganismen uden nogen andre samtidige mikroorganismer såsom *Pseudomonas striata* og *Bacillus megaterium*, hvorved den adskiller sig fra de kulturer, der anvendes ved de fremgangsmåder, som er beskrevet i "Acta Microbiologica Sinica" 21(2),
20 185-191 (1981) som nævnt ovenfor og i EP 278 447, hvor anvendelsen af blandede kulturer er beskrevet.

- Den anvendte mikroorganismestamme er deponeret i Deutsche Sammlung von Mikroorganismen i Göttingen med DSM nr. 4025 den 17. marts 1987 i henhold til Budapest-Traktaten (dette instituts nuværende adresse er:
25 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, Forbundsrepublikken Tyskland).

Cellerne af DSM nr. 4025-mikroorganismen er stavformede med afrundede ender. Diameteren af en celle af mikroorganismen er i gennemsnit ca. 0,3-0,6 μm , længden ca. 0,9-1,6 μm , især 1-1,5 μm .

- 30 I en foretrukken udførelsesform af den foreliggende opfindelse udføres fremstillingen af 2-keto-L-gulonsyre ved dyrkning af den ovenfor nævnte mikroorganisme i et medium, der indeholder L-sorbose og gær eller et gærprodukt samt passende næringsstoffer. Alternativt kan

denne fremgangsmåde udføres ved dyrkning af mikroorganismen i ovennævnte medium, hvorefter de hele celler, der isoleres fra kulturen, eller en cellefri ekstrakt deraf bringes i kontakt med L-sorbose.

Den gær, der anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, omfatter en
 5 hvilken som helst gær, der tilhører underklassen *Ascomycetes*, især
 slægten *Saccharomyces* såsom *Saccharomyces cerevisiae* (bagergær),
Saccharomyces carlsbergensis (*Saccharomyces uvarum*) (bryggerigær)
 eller *Saccharomyces sake*, eller slægten *Schizosaccharomyces* såsom
Schizosaccharomyces pombe, eller slægten *Pichia* såsom *Pichia mem-*
 10 *branaefaciens*, eller slægten *Hansenula* såsom *Hansenula anomala*, eller
 gær hørende til underklassen *Hyphomycetes*, især slægten *Candida* såsom
Candida tropicalis eller *Candida utilis*, eller slægten *Torulopsis*
 såsom *Torulopsis versatilis* (*Candida versatilis*) eller *Torulopsis*
 15 *holmii* (*Candida holmii*), eller et gærprodukt deraf. De ovenfor nævnte
 gærstammer er frit tilgængelige fra deponeringsinstitutioner eller
 fra kommercielle kilder. Således kan de ovenfor nævnte gærstammer,
 der tilhører arten *Saccharomyces cerevisiae*, fås fra private firmaer,
 fx i form af bagergær. Fx kan følgende typer bagergær fås fra følgen-
 de firmaer:

- 20 Oriental-gær (Oriental Yeast Co.)
 Kaneka-gær (Kanegafuchi Chemical Industry Co.)
 Daiya-gær (Kyowa Hakko Kogyo Co.)
 Sankyo-gær (Sankyo Co.)
 Chuetsu-gær (Chuetsu Yeast Co.)
 25 Yeast 45 (Toyo Jozo Co.)
 Nitten-gær (Nippon Beet-Sugar Co.)

Desuden kan følgende gærstammer også fås hos IFO (Institute for Fermentation, Osaka, Japan):

- | | | |
|----|--|----------|
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | IFO 1234 |
| 30 | <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
(<i>Saccharomyces uvarum</i>) | IFO 0565 |
| | <i>Saccharomyces sake</i> | IFO 0309 |
| | <i>Candida tropicalis</i> | IFO 1400 |
| | <i>Candida utilis</i> | IFO 0396 |

	<i>Torulopsis versatilis</i>	IFO 10056
	(<i>Candida versatilis</i>)	
	<i>Torulopsis holmii</i>	IFO 1629
	(<i>Candida holmii</i>)	
5	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	IFO 0362
	<i>Pichia membranaefaciens</i>	IFO 10215
	<i>Hansenula anomala</i>	IFO 10213

Det er essentielt, at den gær, der anvendes ved den foreliggende fremgangsmåde, indeholder vækstfaktorer for de mikroorganismer, der anvendes ifølge den foreliggende opfindelse. De almindelige egenskaber for sådanne vækstfaktorer er varmestabilitet og opløselighed i vand.

Den gær eller de gærprodukter, der anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, omfatter såkaldt "frisk gær", tørgær, gærekstrakt og lignende. Udtrykket "frisk gær" betegner i nærværende sammenhæng gærceller, der netop er opsamlet fra dyrkningsvæsken ved hjælp af centrifugering, filtrering eller lignende. Bagergær, således som det forhandles i almindelig form, er en specifik repræsentant for en sådan "frisk gær". Imidlertid kan der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen også med fordel anvendes frisk gær såsom bagergær efter opvarmning ved fx 121°C. Faktisk foretrækkes anvendelse af steriliseret gær, da levende gær vil metabolisere en del af det L-sorbose, der benyttes som substrat, og derved reducere 2-KGA-udbyttet. Således udgør anvendelse af steriliseret gær såsom steriliseret bagergær en særlig foretrukken udførelsesform af den foreliggende opfindelse.

Hvis mikroorganismen dyrkes i et næringsmedium indeholdende L-sorbose samt gær eller et gærprodukt, dyrkes mikroorganismen hensigtsmæssigt i et vandigt medium under aerobe betingelser.

Koncentrationen af den ovenfor nævnte gær ifølge den foreliggende opfindelse er fortrinsvis fra ca. 5 g/l til ca. 150 g/l beregnet efter vådvægt i mediet, især fra ca. 20 g/l til ca. 100 g/l beregnet efter vådvægt i mediet.

Den foreliggende fermenteringsfremgangsmåde kan udføres ved en pH mellem ca. 4,0 og 9,0, fortrinsvis mellem ca. 6,0 og 8,0.

Et foretrukket temperaturområde til udførelse af den foreliggende fermenteringsfremgangsmåde er mellem ca. 13 og 36°C. Især udføres den
5 foreliggende fermenteringsfremgangsmåde ved en temperatur mellem ca. 18 og 33°C.

Selv om fermenteringsperioden kan variere afhængigt af anvendt pH, temperatur og næringsmedium, giver 2-5 dage sædvanligvis gunstige resultater.

10 Koncentrationen af det L-sorbose, der anvendes som udgangsmateriale ved den foreliggende fremgangsmåde, kan variere mellem ca. 20 og 250 g/l, fortrinsvis mellem ca. 50 og ca. 200 g/l.

Det ved den foreliggende fermenteringsfremgangsmåde anvendte dyrkningsmedium indeholder sædvanligvis næringsstoffer for mikroorganis-
15 merne såsom assimilerbare carbonkilder, fordøjelige nitrogenkilder og uorganiske stoffer, vitaminer, sporelementer og andre vækstfremmende faktorer. Ud over L-sorbose, der anvendes som udgangsmateriale ved den foreliggende fremgangsmåde, kan der også tilsættes andre stoffer, som er carbonkilder, såsom glycerol, D-glucose, D-mannitol,
20 D-fructose, D-arabitol og lignende.

Forskellige organiske eller uorganiske stoffer kan også anvendes som nitrogenkilder ved den foreliggende fremgangsmåde såsom kødekstrakt, pepton, casein, majsstøbevæske, urinstof, aminosyrer, nitrater, ammoniumsalte og lignende. Som uorganiske stoffer kan der anvendes
25 magnesiumsulfat, kaliumphosphat, ferro- og ferrichlorider, calciumcarbonat og lignende.

I det tilfælde, hvor der benyttes fordyrkede hele celler, som er opsamlet fra kulturen, udføres dyrkningen af mikroorganismen under de samme eller lignende betingelser som beskrevet ovenfor. Disse hele
30 celler anvendes i et vandigt medium under aerobe betingelser, og ingen yderligere næringsstoffer (ud over det L-sorbose, der anvendes som udgangsmateriale) er nødvendige.

Hvis der anvendes cellefrie ekstrakter fra kulturen, sættes disse ekstrakter til substratet i et vandigt medium og anvendes ved omdannelsen af L-sorbose til 2-keto-L-gulonsyre under aerobe betingelser på lignende måde som anført ovenfor, og i dette tilfælde er yderligere næringsstoffer heller ikke nødvendige.

Den 2-keto-L-gulonsyre, der fås ved den foreliggende fremgangsmåde, kan fx isoleres fra reaktionsblandingen ved dannelse af et salt eller under anvendelse af forskelle i egenskaber mellem produktet og de omgivende urenheder såsom opløselighed, absorberbarhed og distributionskoefficient mellem opløsningsmidlerne. Adsorption, fx på ionbytterharpikser, udgør en hensigtsmæssig metode til isolering af produktet. Det således vundne produkt kan oprensnes yderligere på konventionel måde, fx ved omkrystallisation eller kromatografi.

Alternativt kan reaktionsblandingen anvendes direkte til omdannelse til L-ascorbinsyre ved esterificering, efterfulgt af enolisering og lactonisering.

Opfindelsen vil i det følgende blive beskrevet nærmere under henvisning til nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

Et podedyrkningsmedium indeholdende 8,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol, 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,75% majsstøbevæske, 0,25% gærekstrakt B-II (Oriental Yeast Co.), 0,5% $CaCO_3$ og 0,5% urinstof (separat steriliseret) (pH 7,0 før sterilisation) blev fordelt i reagensglas (5 ml i hver) og steriliseret ved 121°C i 20 minutter. I dette podedyrkningsmedium blev der inokuleret et podeøjefuld celler af mikroorganismen DSM nr. 4025, der var dyrket på et skråkulturmedium indeholdende 3,0% glycerol, 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,75% majsstøbevæske, 0,25% gærekstrakt B-II, 0,5% $CaCO_3$, 0,5% urinstof (separat steriliseret) og 2,0% agar (pH 7,0 før sterilisation) ved 27°C i 4 dage, og mediet blev inkuberet ved 30°C i 24 timer. Den resulterende podekultur blev inokuleret i 50 ml af det samme podedyrkningsmedium som

- beskrevet ovenfor i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe og inkuberet i 24 timer ved 30°C. Det basale produktionsmedium (50 ml) indeholdende 8,0% L-sorbose (steriliseret separat), 0,05% glycerol, 1,0% urinstof (steriliseret separat), 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5% $CaCO_3$ og 3,0% majsstøbevæske blev tilsat 0,5% gærekstrakt B-II og/eller 5% bagergær (Oriental Yeast Co.) i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe og steriliseret ved 121°C i 20 minutter. Disse produktionsmedier tilsattes hver 5 ml af den ovenfor fremstillede podekultur og blev inkuberet ved 30°C i 4 dage ved en agitationshastighed på 180 omdr./minut.
- 10 Ved højtryksvæskrokromatografisk analyse blev indholdet af 2-keto-L-gulonsyre (2-KGA) i dyrkningsvæsken tilsat bagergær bestemt til at være 72,1 g/l (omdannelsesgrad: 93,7%). På den anden side var 2-KGA-indholdet i de væsker, der var tilsat gærekstrakt B-II og gærekstrakt B-II/bagergær henholdsvis 57,1 (omdannelsesgrad: 88,8%) og 64,9 g/l
- 15 (omdannelsesgrad: 94,4%).

EKSEMPEL 2

- Et podedyrkningsmedium indeholdende 8,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol, 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,75% majsstøbevæske, 5,0% bagergær, 0,5% $CaCO_3$ og 0,5% urinstof (separat steriliseret) (pH 7,0 før sterilisation) blev fordelt i reagensglas (5 ml i hver) og steriliseret ved 121°C i 20 minutter. I dette podedyrkningsmedium blev der inokuleret et podeøjefuld celler af mikroorganismen DSM nr. 4025, der var dyrket på et skråkulturmedium indeholdende 5,0% D-mannitol, 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,75% majsstøbevæske, 0,25% bagergær, 0,5% $CaCO_3$, 0,5%
- 20 urinstof (separat steriliseret) og 2,0% agar (pH 7,0 før sterilisation) ved 27°C i 4 dage, og mediet blev inkuberet ved 30°C i 24 timer. Den resulterende podekultur blev inokuleret i 50 ml af det samme podedyrkningsmedium som beskrevet ovenfor i en 500 ml Erlenmeyer-
- 30 (50 ml) indeholdende 10,0% L-sorbose (steriliseret separat), 0,05% glycerol, 1,6% urinstof (steriliseret separat), 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5% $CaCO_3$ og 3,0% majsstøbevæske blev tilsat de i tabel 1 anførte gærtyper i 500 ml Erlenmeyer-kolber og steriliseret i 20 minutter ved 121°C. Disse produktionsmedier blev tilsat 5 ml hver af podekulturen

som fremstillet ovenfor og inkuberet ved 30°C i 4 dage med en agitationshastighed på 180 omdr./minut.

2-KGA-værdier i kolber under forskellige betingelser er angivet i tabel 1.

5

TABEL 1

Virkning af forskellige gærtyper anvendt som mediebestanddel på 2-KGA-produktion

10	Gærtyper	Kilde	Mængde (%)	2-KGA (g/l)	Resterende L-sorbose (g/l)	Celle-vækst
15	Gærekstrakt B-II	Oriental	0,25	68,5	31,1	+
			0,5	74,1	25,3	+
	Gærpulver HG (tørgær)	Oriental	0,25	75,6	23,0	+
			0,5	79,4	20,9	+
20	Yeasta 20A (tørgær)	Bovril ¹⁾	0,25	84,2	15,3	++
			0,5	87,3	12,0	++
	Saf-instant (tørgær)	S.I. Lesaffre ²⁾	0,25	81,1	17,4	++
			0,5	86,0	13,8	++
	Oriental-tørgær	Oriental	0,25	76,8	21,3	++
			0,5	86,5	13,7	++
25	Bagergær (<i>S. cerevisiae</i>)	Oriental	5,0	93,5	8,9	+++
			6,25	97,2	4,4	+++
30	Ingen		0	4,0	93,0	±

Grad af vækst: ± dårlig → +++ god

1) *Saccharomyces cerevisiae* fra Oriental Yeast Co.

2) Bagergær

EKSEMPEL 3

På samme måde som beskrevet i eksempel 2 blev der fremstillet en podekultur, som blev inokuleret i 50 ml af et produktionsmedium indeholdende 9,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol, 3,0% majsstøbevæske, 1,4% urinstof (separat steriliseret), 5,6% bagergær, 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og 1,5% CaCO_3 i en 500 ml Erlenmeyer-koble og inkuberet ved 30°C i 4 dage med en agitationshastighed på 180 omdr./minut.

Som resultat heraf blev der produceret 89,0 g/l (omdannelsesgrad: 91,8%) 2-KGA.

EKSEMPEL 4

På samme måde som beskrevet i eksempel 2 blev der fremstillet en podekultur, som blev inokuleret i 50 ml af et produktionsmedium indeholdende 10,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol, 3,0% majsstøbevæske, 1,6% urinstof (separat steriliseret), 6,25% bagergær, 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og 1,5% CaCO_3 i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe og inkuberet ved 30°C i 4 dage med en agitationshastighed på 180 omdr./minut.

Som resultat heraf blev der produceret 97,2 g/l (omdannelsesgrad: 90,2%) 2-KGA.

EKSEMPEL 5

På samme måde som beskrevet i eksempel 2 blev der fremstillet en podekultur, som blev inokuleret i 50 ml af et produktionsmedium indeholdende 12,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol, 3,0% majsstøbevæske, 1,9% urinstof (separat steriliseret), 7,5% bagergær, 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og 1,5% CaCO_3 i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe og inkuberet ved 30°C i 4 dage med en agitationshastighed på 180 omdr./minut.

Som resultat heraf blev der produceret 98,5 g/l (omdannelsesgrad: 89,4%) 2-KGA.

EKSEMPEL 6

På samme måde som beskrevet i eksempel 2 blev der fremstillet en
5 podekultur, som blev inokuleret i 50 ml af et produktionsmedium
indeholdende 8,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol,
3,0% majsstøbevæske, 1,25% urinstof (separat steriliseret), 0,25%
MgSO₄·7H₂O, 1,5% CaCO₃ og 2-5% bagergær og inkuberet ved 30°C i 3-4
dage.

10 Det fremgår af tabel 2, at der blev produceret 82,6 g/l (omdannelses-
grad: 95,8%) 2-KGA efter 4 dages inkubation i mediet, der var tilsat
4% bagergær.

TABEL 2

Virkning af koncentration af bagergær
på 2-KGA-produktion

15

Bagergær	Produceret 2-KGA (g/l)		
	3 dage	4 dage	(Omdannelse: %)
20 2	75,1	77,5	(95,4)
3	80,6	81,3	(94,3)
4	81,6	82,6	(95,8)
5	81,8	82,6	(95,8)

25 EKSEMPEL 7

På samme måde som beskrevet i eksempel 2 blev der fremstillet 200 ml
af en podekultur. En 3 liters krukkefermentor blev tilsat 1,2 liter
basalt medium indeholdende 0,05% glycerol, 3,0% majsstøbevæske, 5,0%
bagergær og 0,25% MgSO₄·7H₂O for at komme op på 2,0 liter, og det

hele blev steriliseret ved 121°C i 20 minutter. 8% L-sorbose (slutkoncentration) og 1,25% urinstof (slutkoncentration) blev separat steriliseret og tilsat fermentoren. Efter inokulering med podekulturen blev kulturvolumenet indstillet til 2 liter ved tilsætning af steriliseret vand. Fermenteringen blev udført ved 30°C og 800 omdr./minut til agitation og 1 liter/minut til beluftning. Kulturens pH blev holdt på 7,0 med 4N Na₂CO₃.

I løbet af 40 timers fermentering blev der produceret 84 g/l (omdannelsesgrad: 97,4%) 2-KGA.

10 EKSEMPEL 8

På samme måde som beskrevet i eksempel 7 blev der udført en 3 liters krukkefermentering i et medium indeholdende 10,0% L-sorbose, 1,6% urinstof, 0,05% glycerol, 0,25% MgSO₄·7H₂O, 3,0% majsstøbevæske og 6,25% bagergær.

15 Som resultat heraf blev der i løbet af 50 timers fermentering produceret 100,0 g/l (omdannelsesgrad: 92,8%) 2-KGA.

EKSEMPEL 9

20 På samme måde som beskrevet i eksempel 7 blev der udført en 3 liters krukkefermentering i et medium indeholdende 12,0% L-sorbose, 1,9% urinstof, 0,05% glycerol, 0,25% MgSO₄·7H₂O, 3,0% majsstøbevæske og 7,5% bagergær.

Som resultat heraf blev der i løbet af 75 timers fermentering produceret 98,0 g/l (omdannelsesgrad: 92,3%) 2-KGA. 21,5 g/l L-sorbose forblev uopbrugt.

EKSEMPEL 10

En 3 liters krukkefermentering blev startet på samme måde som beskrevet i eksempel 7. Samtidigt blev 80 g L-sorbose solubiliseret i 400 ml vand og steriliseret ved 121°C i 20 minutter, hvorefter det
5 kontinuerligt blev ført ind i fermentoren med en hastighed på ca. 11 ml/minut fra 6-42 timers fermentering. Efter afslutning af L-sorbose-tilførslen blev fermenteringen fortsat i yderligere 25 timer. Den samlede fermenteringsperiode var 67 timer. I dyrkningsvæsken (2,6 liter) blev der produceret 95 g/l 2-KGA. I alt blev der produceret
10 247 g 2-KGA ud fra 240 g L-sorbose. Molær omdannelsesgrad: 95,5%.

EKSEMPEL 11

En 3 liters krukkefermentering blev startet på samme måde som beskrevet i eksempel 7. På den anden side blev 120 g L-sorbose solubiliseret i 400 ml vand og steriliseret ved 121°C i 20 minutter, hvorefter
15 det kontinuerligt blev ledt ind i fermentoren med en hastighed på ca. 11 ml/minut fra 6 timers til 42 timers fermentering. Efter afslutning af L-sorbosetilførslen blev fermenteringen fortsat i yderligere 35 timer. Den samlede fermenteringsperiode var 77 timer. I dyrkningsvæsken (2,7 liter) blev der produceret 104 g/l 2-KGA. I alt blev der
20 produceret 280,8 g 2-KGA ud fra 280 g L-sorbose. Molær omdannelsesgrad: 93,1%.

EKSEMPEL 12

En 3 liters krukkefermentering blev startet på samme måde som beskrevet i eksempel 7. På den anden side blev 160 g L-sorbose solubiliseret i 400 ml vand og steriliseret ved 121°C i 20 minutter, hvorefter
25 det kontinuerligt blev ledt ind i fermentoren med en hastighed på ca. 11 ml/minut fra 6 timers til 42 timers fermentering. Efter afslutning af L-sorbosetilførslen blev fermenteringen fortsat i yderligere 49 timer. Den samlede fermenteringsperiode var 91 timer. I dyrkningsvæsken (2,7 liter) blev der produceret 110 g/l 2-KGA. I alt blev der
30

produceret 297 g 2-KGA ud fra 320 g L-sorbose. Molær omdannelsesgrad: 86,1%.

EKSEMPEL 13

På samme måde som beskrevet i eksempel 2 blev der fremstillet en
 5 podekultur. 5 ml af hver af podekulturerne blev inokuleret i 50 ml
 produktionsmedier indeholdende 10% L-sorbose (steriliseret separat),
 0,05% glycerol, 1,6% urinstof (steriliseret separat), 0,25%
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,0% majsstøbevæske, 1,5% $CaCO_3$ og 6,25% bagergær fra
 forskellige leverandører som anført i tabel 3 i 500 ml Erlenmeyer-
 10 kolber. Fermenteringen blev udført ved 30°C i 4 dage med en agita-
 tionshastighed på 180 omdr./minut. Resultaterne er vist i tabel 3.

TABEL 3

Virkning af forskellige typer bagergær på 2-KGA-produktion

15	Type bagergær	2-KGA (g/l)	(Omdannelse) (%)	Resterende L-sorbose (g/l)
	Oriental-gær	97,2	(94,4)	4,4
	Kaneka-gær	91,4	(90,5)	6,3
20	Daiya-gær	94,6	(92,3)	4,9
	Sankyo-gær	87,4	(88,7)	8,6
	Chuhetsu-gær	93,7	(92,2)	5,7
	Yeast 45	90,1	(89,5)	6,6
25	Nitten-gær	97,2	(93,8)	3,8

EKSEMPEL 14

Et basalt produktionsmedium (5 ml), der indeholdt 8% L-sorbose (ste-
 riliseret separat), 0,05% glycerol, 1,25% urinstof (steriliseret se-
 parat), 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5% $CaCO_3$ og 3,0% majsstøbevæske (pH 7,5
 30 før sterilisation), blev tilsat gærceller (5% vådvægt/volumen), for-

delt i reagensglas (1,8 x 20 cm) og steriliseret ved 121°C i 20 minutter. Som gærceller anvendtes kulturer af *Saccharomyces sake* IFO 0309, *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0362, *Saccharomyces carlsbergensis* IFO 0565, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1234, *Candida utilis* IFO 0396, *Candida tropicalis* IFO 1400, *Torulopsis holmii* IFO 1629, *Torulopsis versatilis* IFO 10056, *Hansenula anomala* IFO 10213 og *Pichia membranaefaciens* IFO 10215 på et agardyrkningsmedium indeholdende 1,0% maltekstrakt (Difco), 0,1% gærekstrakt (Difco), 0,1% soytone (Difco), 1,0% glucose og 2,0% agar, der var dyrket ved 27°C i 4 dage.

10 I hvert af produktionsmedierne blev der inokuleret 0,5 ml af podekulturerne af mikroorganismen DSM nr. 4025, der var fremstillet på samme måde som beskrevet i eksempel 2, og det hele blev inkuberet ved 30°C i 4 dage.

2-KGA-værdierne i reagensglas under forskellige betingelser er vist i

15 tabel 4.

TABEL 4

Virkning af gærtyper hørende til slægterne
Saccharomyces, *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula* og *Pichia*
anvendt som mediebestanddel på 2-KGA-produktion

5	Gærtyper	Mængde (%)	2-KGA (g/l)	Resterende L-sorbose (g/l)
10	<i>Saccharomyces sake</i> IFO 0309	5,0	74,37	5,56
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> IFO 0362	5,0	77,99	1,46
	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> IFO 0565	5,0	70,82	2,61
15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1234	5,0	72,39	3,89
	<i>Candida utilis</i> IFO 0396	5,0	71,05	0
20	<i>Candida tropicalis</i> IFO 1400	5,0	80,95	2,91
	<i>Torulopsis holmii</i> IFO 1629	5,0	72,20	6,32
	<i>Torulopsis versatilis</i> IFO 10056	5,0	78,01	0
25	<i>Hansenula anomala</i> IFO 10213	5,0	75,91	1,97
	<i>Pichia membranaefaciens</i> IFO 10215	5,0	65,56	12,78
30				

REFERENCEKSEMPEL

Et podedyrkningsmedium S1 indeholdende 8,0% L-sorbose (separat steriliseret), 0,05% glycerol, 0,25% MgSO₄·7H₂O, 1,5% gærekstrakt B-II og 1,5% CaCO₃ (separat steriliseret) (pH 7,0 før sterilisation) blev

fordelt i reagensglas (5 ml i hver) og steriliseret ved 121°C i 20 minutter. I dette podedyrkningsmedium blev der inokuleret et podeøjefuld celler af *Gluconobacter oxydans* U-13 (FERM-BP nr. 1269), der var dyrket på et skråkulturmedium, og det hele blev inkuberet ved 30°C i 5 48 timer. Den resulterende podekultur blev inokuleret i 50 ml af det samme podedyrkningsmedium som beskrevet ovenfor i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe og inkuberet i 48 timer ved 30°C. På den anden side blev der fremstillet en anden podekultur under anvendelse af et podedyrkningsmedium S2, der indeholdt 8,0% L-sorbose, 0,25% MgSO₄·7H₂O, 0,05% 10 glycerol, 1,5% CaCO₃, 0,5% urinstof, 1,75% majsstøbevæske og 5,0% bagergær, på samme måde som beskrevet ovenfor. De således fremstillede podekulturer S1 og S2 blev inokuleret i produktionsmediet på samme måde som beskrevet i eksempel 2. Fermenteringen blev udført ved 30°C i 4 dage.

15 Det opnåede 2-KGA-udbytte var 12,8 g/l i tilfælde af dyrkningsmedium S1 og 10,2 g/l i tilfælde af dyrkningsmedium S2. Dette viser, at *Gluconobacter oxydans* U-13 (FERM-BP nr. 1269), der i form af en ren kultur har evne til at vokse og producere 2-KGA, ikke gav 2-KGA i højt udbytte i gærholdige produktionsmedier.

20 PATENTKRAV

,1. Fremgangsmåde til fremstilling af 2-keto-L-gulonsyre ved fermentativ omdannelse af L-sorbose under anvendelse af *Gluconobacter oxidans* DSM nr. 4025, der som sådan i det væsentlige ikke har nogen evne til at vokse og producere 2-keto-L-gulonsyre, 25 k e n d e t e g n e t ved, at der som den eneste mikroorganisme udover gær anvendes en ren kultur af mikroorganismen, og at fermenteringen udføres i nærværelse af gær eller et gærprodukt som mediebestanddel.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 30 k e n d e t e g n e t ved, at der som mediebestanddel anvendes gær, der tilhører underklassen *Ascomycetes*, især slægten *Saccharomyces* såsom *Saccharomyces cerevisiae* (bagergær), *Saccharomyces carlsbergensis* (*Saccharomyces uvarum*) (bryggerigær) eller *Saccharomyces sake*,

- eller slægten *Schizosaccharomyces* såsom *Schizosaccharomyces pombe*, eller slægten *Pichia* såsom *Pichia membranaefaciens*, eller slægten *Hansenula* såsom *Hansenula anomala*, eller gær hørende til underklassen *Hyphomycetes*, især slægten *Candida* såsom *Candida tropicalis* eller
- 5 *Candida utilis*, eller slægten *Torulopsis* såsom *Torulopsis versatilis* (*Candida versatilis*) eller *Torulopsis holmii* (*Candida holmii*), eller et gærprodukt deraf.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at der som mediebestanddel anvendes frisk
- 10 gær, fortrinsvis efter sterilisation.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at gæren anvendes i en koncentration på fra ca. 5 g/l til ca. 150 g/l beregnet efter vådvægt, fortrinsvis fra ca. 20 g/l til ca. 100 g/l beregnet efter vådvægt.
- 15 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at L-sorbose anvendes i en koncentration på fra ca. 20 g/l til ca. 250 g/l, fortrinsvis fra ca. 50 g/l til ca. 200 g/l.
6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5,
20 k e n d e t e g n e t ved, at 2-keto-L-gulonsyre produceres med et udbytte på mindst 72 g/l, fortrinsvis mindst 100 g/l.
7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6,
k e n d e t e g n e t ved, at fermenteringen udføres ved en pH mellem ca. 4,0 og 9,0, fortrinsvis mellem ca. 6,0 og 8,0.
- 25 8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7,
k e n d e t e g n e t ved, at fermenteringen udføres ved en temperatur mellem ca. 13 og 36°C, fortrinsvis mellem ca. 18 og 33°C.