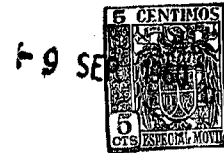


20 SEP. 1930
PATENTES
ESTADOS UNIDOS

261118



261118

PATENTE DE INTRODUCCION

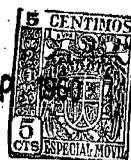
por 10 años

por "UN PROCEDIMIENTO PERFECCIONADO PARA LA FABRICACION DE DIHIDROXIACETONA", a favor de Industrial Ibérica Químico-Farmacéutica, S.A., de nacionalidad española, domiciliada en Barcelona, Loreto, 8.

=====

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta Patente de introducción se refiere a un método perfeccionado para la producción de dihidroxiacetona por fermentación microbiana. Mas particularmente, esta invención se refiere a la utilización de miembros del género Acetobacter para la conversión microbiana practicable comercialmente, de glicerol en dihidroxiacetona. Este procedimiento ha sido dado a conocer con gran éxito, recientemente en Estados Unidos de América.



261118

La dihidroxiacetona, $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$, es un material que, a causa de la presencia de dos grupos hidroxilos separados altamente reactivos, es valioso como intermediario químico para la síntesis de gran número de productos químicos orgánicos. La dihidroxiacetona ha sido utilizada como catalizador en formulas de polimerización de butadieno-estireno y como un catalizador eficaz para la condensación de formaldehido en hidroxialdehidos e hidroxiketonas. También, esterificando los grupos hidroxilo de la dihidroxiacetona con ácidos grasos tales como ácido palmitico, se forman sustancias activas superficialmente. Estas sustancias activas superficialmente tienen propiedades emulsificantes que las hacen útiles en las industrias de alimentación y detergentes.

La conversión microbiana de glicerol en dihidroxiacetona es bien conocida. Ciertas referencias escritas sugieren el uso del *Acetobacter suboxydans* para lograr esta conversión microbiana. Sin embargo, ninguno de los métodos, procesos y técnicas descritas en la literatura podrian ser empleados para la producción comercial practicable de dihidroxiacetona. Para que sea comercialmente practicable, un proceso de fermentación para la conversión de glicerol en dihidroxiacetona debe satisfacer ciertas condiciones. Debe ser posible incorporar en el medio de fermentación un porcentaje relativamente alto en peso de glicerol. Por consideraciones de coste, la conversión de glicerol en dihidroxiacetona debe ser tan completa como sea posible. Tal conversión esencialmente completa es necesaria para una elevada producción de dihidroxiacetona de alta pureza, ya que la dihidroxiacetona en presencia de cantidades sustanciales de glicerol, es cristalizabile solamente con



grandes dificultades, y se obtiene un producto de baja calidad con rendimiento muy bajo. Asimismo, esta conversi3n microbiana de dihidroxiacetona en glicerol debe tener lugar en un periodo de tiempo relativamente corto, para que el coste del equipo y mano de obra para una cantidad dada de dihidroxiacetona sea m3nimo.

Los procesos descritos en la literatura cient3fica para la conversi3n microbiana de glicerol en dihidroxiacetona se refieren principalmente a medios de fermentaci3n que contienen glicerol en concentraciones que van de un 2% a un 8% en peso. Puesto que ha sido un hecho comunmente aceptado que el incremento de las concentraciones de glicerol resulta en una disminuci3n del porcentaje de conversi3n en dihidroxiacetona, la mayor3a de la literatura publicada que se refiere a esta fermentaci3n concierne a medios que contienen solamente un 2% de glicerol. A este respecto, informes en la literatura tan reciente como 1947, contienen la afirmaci3n de que en la fermentaci3n microbiana de glicerol en dihidroxiacetona, la concentraci3n de glicerol no debe exceder un 6%.

La literatura que refiere un rendimiento decreciente de dihidroxiacetona con un contenido creciente de glicerol en el medio de fermentaci3n, tambi3n afirma que un acusado aumento en el tiempo de fermentaci3n es necesario de manera persistente para oxidar de manera eficaz elevadas concentraciones de glicerol, por ejemplo por lo menos 12 d3as se requerir3an para obtener dihidroxiacetona con un rendimiento aceptable de un medio que contuviera un 25% de glicerol. Otras publicaciones refieren que medios que contengan 4½-5½% de glicerol, cuando se inoculan con *Acetobacter suboxydans* requieren 14 d3as para



obtener rendimientos de conversión de un 88-92% de glicerol en dihidroxiacetona.

El principal objeto de esta invención es proveer un método para la conversión microbiana de glicerol en dihidroxiacetona, en el que una conversión cuantitativa sustancialmente completa se logra en un periodo de tiempo relativamente corto, empleando un medio de fermentación que contenga un porcentaje más elevado de glicerol que hasta el momento se había creído practicable.

Otros objetivos quedarán evidentes de la descripción detallada que sigue.

En la práctica de esta invención, se utiliza un miembro del género *Acetobacter suboxydans* para la conversión de glicerol en dihidroxiacetona empleando un medio que contiene ciertos constituyentes inorgánicos y glicerol en más de un 6% en peso. Además la preparación del cuerpo a inocular en la fermentación se lleva a cabo en una escala restringida de pH.

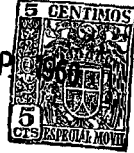
La conversión de glicerol en dihidroxiacetona es una reacción oxidante. Es bien sabido que la relación de oxidación por microorganismos, está relacionada directamente con el número de microorganismos vivos presentes en el medio de fermentación es decir, como más alto sea el número de microorganismos, mayor es la relación de oxidación. Es también bien conocido que el óptimo pH para el desarrollo de *Acetobacter suboxydans* es pH 6,5 y podría esperarse que el mayor grado de conversión oxidante de glicerol en dihidroxiacetona tuviera lugar con este pH. De manera sorprendente, de acuerdo con esta invención, se pueden obtener rendimientos mucho mayores de dihidroxiacetona cuando el cuerpo a inocular en la fermentación es



desarrollado a niveles de pH sustancialmente mas bajos
que pH 6,5, que los que son obtenidos cuando este cuer-
po a inocular es desarrollado en el pH mas alto, aún cuan-
do el desarrollo del microorganismo es mucho más rápido
5 y extenso con el pH alto en el medio de fermentación así
como en el de inoculación.

Asimismo, de acuerdo con esta invención, se ha des-
cubierto que se requieren ciertos compuestos inorgánicos
para la oxidación rápida y sustancialmente completa de
10 glicerol en dihidroxiacetona por medio del Acetobacter
suboxydans cuando la concentración de glicerol en el me-
dio de fermentación se incrementa a mas de un 6% en peso.
Estos constituyentes inorgánicos están presentes en y son
suministrados por un licor de maiz. Tanto el licor de
15 maiz que se puede encontrar en el comercio o el material
inorgánico obtenido reduciendo a cenizas este licor de
maiz, facilita los resultados beneficiosos. Preferible-
mente el licor de maiz (o las cenizas del mismo en una
proporción equivalente) comprende de 0,1% a 5% en peso
20 del medio de fermentación.

De conformidad con las observaciones anteriores de
la técnica, en el desarrollo de la presente invención se
observó que con un pH 6,5, en medios que contenian 2%
de glicerol, el glicerol podía ser oxidado rápida y com-
pletamente en dihidroxiacetona por el Acetobacter suboxydans
25 Sin embargo, en otras fermentaciones comparables, un incre-
mento en la concentración del glicerol al 6% y 11% resul-
taron en conversiones de glicerol en dihidroxiacetona de
solamente 60% y 44% respectivamente. De acuerdo con esta
30 invención, cuando la preparación del medio de inoculación
es llevada a cabo en un pH comprendido entre 5,0 y 5,9 y



cuando el licor de maiz o las cenizas del mismo se añaden al medio de fermentación, pueden ser obtenidas conversiones para la fermentación de más del 85% para el 6% así como el 11% de glicerol. Es la realización de estos elevados niveles de conversión que hacen factible la utilización de técnicas microbianas de fermentación para la producción comercial de dihidroxiacetona.

En la ausencia de un adecuado control del pH en el cuerpo a inocular, la presencia del licor de maiz en el medio de fermentación no suministra por si mismo los grados de conversión altamente remarcables de glicerol en dihidroxiacetona que se obtienen en la práctica de la presente invención. Esto es, medios de fermentación que contienen licor de maiz y 11% de glicerol, cuando se inoculan con un cuerpo de inoculación de acetobacter suboxydans que fué preparado con un pH de 6,1, da lugar a condiciones tales que solamente el 55% del glicerol se convierte en dihidroxiacetona después de que la fermentación se ha prolongado 71 horas. Por otro lado el mismo medio de fermentación cuando se inocula con un cuerpo de inoculación de Acetobacter suboxydans que fué preparado a un pH de 5,5 facilita condiciones tales que el 96% del glicerol se convierte en dihidroxiacetona en 30 horas.

En la práctica de la presente invención, el cuerpo a inocular para el medio de fermentación, se prepara desarrollando el acetobacter a un pH de cerca 5,0 a 5,9. Resultados particularmente buenos son obtenidos cuando la escala del pH para la preparación del cuerpo a inocular está comprendida entre 5,4 a 5,7. Usualmente, el pH del medio de fermentación está comprendido también dentro de la escala de 5,0 a 5,9.



Utilizando las técnicas de esta invención, es posible obtener de manera uniforme un alto porcentaje de conversión de glicerol en dihidroxiacetona en medios de fermentación que contengan mas del 6% en peso de glicerol.

5 Se obtienen resultados particularmente ventajosos cuando el glicerol comprende de un 6% a 15% en peso del medio de fermentación.

Los ejemplos detallados que siguen, son meramente ilustrativos de los métodos de la presente invención y no deben ser tomados como limitativos del alcance de la misma. La cantidad de los ingredientes presentes en el medio está expresada en términos de porcentajes en peso.

Ejemplo 1^a.

Un cuerpo para inocular en la fermentación, se prepara introduciendo Acetobacter suboxydans en 10 litros de un medio acuoso de la siguiente composición: 0,5% KH_2PO_4 , 0,5% levadura de cerveza, 2% CaCO_3 , 0,5% de licor de maiz y 6,0% de glicerol. El medio se ajusta a un pH de 5,5, inicialmente y se airea a través del periodo de desarrollo. El CaCO_3 sirve como tampón y evita cambios sustanciales en el pH. Después de la incubación del cuerpo a inocular a 30^o C durante 24 horas, el cultivo resultante se utiliza para inocular unos 1900 litros de un medio de fermentación, que en composición es idéntico al medio de inoculación, excepto en que contiene 11% de glicerol. La fermentación se lleva a cabo durante 20 horas a 30^o C con aireamiento, después de cuyo tiempo el caldo de fermentación contiene 10,4% de dihidroxiacetona. Esto representa una conversión del 95% de glicerol en dihidroxiacetona en 20 horas.

Ejemplo 2.

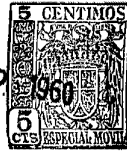


Un cuerpo de inoculación para fermentación se prepara introduciendo *Acetobacter suboxydans* en 10 litros de un medio acuoso de la siguiente composición 0,5% KH_2PO_4 , 0,5% de levadura de cerveza, 2,0% CaCO_3 , 6,0% de glicerol y las cenizas derivadas de una cantidad de licor de maiz equivalente a un 0,5%. El medio se ajusta a un pH de 5,5 y se airea a través del periodo de desarrollo. Después de la incubación del cuerpo a inocular a 30° C durante 24 horas el desarrollo resultante se utiliza para inocular unos 1900 litros de un medio de fermentación que en composición es idéntico al medio de inoculación, excepto en que contiene 10,0% de glicerol. Después de que la fermentación ha durado 25 horas a 30° C con aireación, el análisis muestra que el 97% del glicerol ha sido convertido en dihidroxiacetona.

Ejemplo 3.

Un cuerpo de inoculación para la fermentación prepara introduciendo *acetobacter suboxydans* en 10 litros de un medio acuoso de la siguiente composición: 0,5% KH_2PO_4 , 0,5% de levadura de cerveza, 2,0% CaCO_3 , 0,5% licor de maiz y 6% de glicerol. El medio se ajusta a pH 5,8 inicialmente y se airea durante el periodo de desarrollo. Después de la incubación del cuerpo a inocular a 30° C durante 24 horas, el cultivo resultante se utiliza para inocular unos 1900 litros de un medio de fermentación que en composición es idéntico al medio de inoculación excepto en que contiene 13,5% de glicerol. Después de que la fermentación se ha prolongado durante 25 horas a 30° C con aireación, el análisis muestra que el 90% de glicerol ha sido convertido en dihidroxiacetona.

Mientras que en la descripción anterior ha sido dis-



puesta una descripción detallada del procedimiento de la invención, serán evidentes para aquellos que conozcan la técnica, que muchas modificaciones en los detalles pueden ser hechas sin separarse del espíritu y principios de la invención, por lo que, todo lo que no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los efectos de la actual Patente.

N O T A.

Se reivindica como objeto de esta Patente de introducción:

1.- Un procedimiento perfeccionado para la fabricación de dihidroxiacetona por fermentación microbiana, que comprende la preparación de un cuerpo de inoculación desarrollando el *Acetobacter suboxydans* en un medio de cultivo que contiene glicerol y que tiene un pH de 5,0 a 5,9, introduciendo el cuerpo de inoculación en un medio de fermentación que contiene licor de maíz o el material inorgánico comprendido en el mismo y más de un 6% en peso de glicerol y cuyo pH está comprendido entre 5,0 y 5,9 y permitiendo que la fermentación se desarrolle hasta que ha tenido lugar una conversión sustancial del glicerol en dihidroxiacetona.

2.- El propio procedimiento de la reivindicación anterior, caracterizado porque el medio de inoculación se obtiene por medio de un cultivo en agua de una composición de 0,5% de KH_2PO_4 , 0,5% de levadura de cerveza, 2% de CaCO_3 , que actúa de tampón, 6,0% de glicerol y 0,5% de licor de maíz o bien cenizas del mismo, ajustándose el medio, a un pH comprendido entre 5,5 y 5,8, manteniéndose en aireación a 30° C durante 24 horas.

3.- El propio procedimiento de las reivindicaciones ante-

