

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	475216	10	A1
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	17.11.78		

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente documentación y según el contenido de la Memoria adjunta.

5 MAR. 1979

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
852.950	18-11-77	USA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	
64 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 2,5 -DICETOGLUCONICO.		
71 SOLICITANTE (S)		
PFIZER INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
235 East 42nd Street New York, New York -- ESTADOS UNIDOS.		
75 INVENTOR (ES)		
Donald Albert Kita, de nacionalidad estadounidense y Karlene y Karlene Elizabeth Hall, de nacionalidad jamaicana.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

1 Acetobacter fragum.

 Esta invención se refiere a un procedimiento económico para la preparación de ácido 2,5-dicetoglucónico mediante el uso de cepas fácilmente asequibles y públicamente
5 conocidas de Acetobacter cerinus. Dos de estas cepas, IFO 3263 y 3266, producen ácido 2,5-dicetoglucónico con rendimientos superiores al 95 % (calculado sobre la glucosa).

 El ácido 2,5-dicetoglucónico es un útil intermediario en la preparación de ácido ascórbico. Una solución
10 acuosa de ácido 2,5-dicetoglucónico puede ser selectivamente reducida para formar una mezcla de 2-cetogulonato y 2-cetogluconato que puede ser convertida en ácidos ascórbico y eritórbito.

 El ácido 2,5-dicetoglucónico se prepara fácilmente
15 por acción bacteriana sobre la glucosa empleando, de acuerdo con el procedimiento de esta invención, cepas fácilmente asequibles de Acetobacter cerinus. Todas las cepas de conocimiento público de Acetobacter cerinus han sido sometidas a ensayo y en esta investigación se ha demostrado que producen cetoácidos con un rendimiento del 50-95 % (calculado
20 sobre la glucosa). Cuando se emplea Acetobacter cerinus IFO 3263 o 3266, el cetoácido producido es totalmente el ácido 2,5-dicetoglucónico deseado, con rendimientos superiores al 95 % (calculados sobre la glucosa). Las cepas
25 asequibles y conocidas públicamente de Acetobacter cerinus

1 son las siguientes:

IFO 3262 (ATCC 12303)

3263

3264

5 3265

3266

3267

3268

3269.

10 Estas cepas de Acetobacter cerinus se cultivan en un medio en el que la fuente principal de carbono es la glucosa. Estos microorganismos no requieren costosas fuentes de nitrógeno orgánico como peptona o extracto de carne. Cuando se emplean fuentes de urea y nitrógeno inorgánico
15 como sulfato amónico, nitrato amónico o fosfato amónico, se agrega ácido nicotínico como factor de crecimiento esencial.

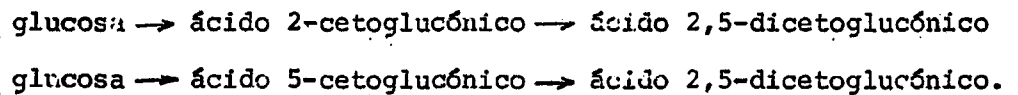
La concentración de glucosa en el medio oscila entre 2,5 y 20 %, preferiblemente entre 10 y 12 %, para
20 obtener ácido 2,5-dicetogluconico en las condiciones más económicas. La temperatura de fermentación está comprendida entre 20 y 35°C, preferiblemente entre 25 y 30°C y todavía mejor alrededor de 28°C. El pH inicial del medio de cultivo puede oscilar entre 3,5 y 7,5, preferiblemente entre
25 5 y 6. En el transcurso de la fermentación, el pH se

1 mantiene alrededor de 5,5 mediante la adición de una so-
lución de hidróxido sódico. Puede utilizarse carbonato
cálcico para controlar el pH y se agrega en el medio de
reposición después de calentar en autoclave en una pro-
5 porción de 30 g por 110 g de glucosa.

Después de la inoculación, el medio de fermentación
se agita con un agitador mecánico a unas 1700 rpm y se
airea a un caudal de 0,5 a 1 volúmenes de aire por volu-
men de caldo por minuto.

10 Empleando Acetobacter cerinus IFO 3263 o 3266,
la fermentación se lleva a cabo hasta que se obtiene un
rendimiento de ácido 2,5-dicetoglucónico del 90 % como
mínimo (calculado sobre la glucosa) (36-40 horas).

15 Se ha determinado por cromatografía en papel que
la conversión de glucosa a ácido 2,5-dicetoglucónico se
produce a través de la siguiente vía:



20 Se utiliza papel Whatman n° 1 y n° 4, empleando un
sistema disolvente de metiletilcetona/acetona/ácido fórmico/agua (50:6:2:12). Las manchas de ácido se localizan ro-
ciando con una solución etanólica al 0,2 % de o-fenilen-
diamina que contiene un 1 % de ácido nítrico y calentando
a unos 70°C (ácido 5-cetoglucónico - azul; ácido 2-cetoglu-
25 cónico - amarillo; ácido 2,5-dicetoglucónico - verde). Tam-

1 bien puede utilizarse para la identificación la cromato-
grafía de líquidos a alta presión.

5 El ácido 2,5-dicetoglucónico puede ser separado y
recuperado del caldo de fermentación final por cualquier
procedimiento convencional conocido por los expertos en
este campo. El caldo de fermentación filtrado puede ser
procesado, por ejemplo por tratamiento con un borohidruro
y la mezcla resultante de ácido 2-cetoglucónico y ácido
2-cetogulónico puede ser hidrolizada para formar los áci-
10 dos ascórbico y eritórbito.

EJEMPLO 1

Se preparó el siguiente medio acuoso de inóculo:

<u>Ingredientes</u>	<u>g/litro</u>
Glucosa	25
15 Licor de infusión de maíz	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	6,3
20 pH	6,2

Un matraz sacudido que contiene 1 litro de medio
se trata en autoclave durante 30 minutos a 121°C. El pH
del medio enfriado es 5,0. Se agregan al matraz células
de Acetobacter cerinus IFO 3263 procedente de un tubo in-
25 clinado de agar nutritivo (5 ml de 20 ml de una suspensión

1 acuosa estéril) y después se sacude en un sacudidor rotatorio a unos 28°C durante 24 horas aproximadamente.

Se agrega una parte alícuota del caldo de cultivo, suficiente para proporcionar un 5 % en volumen de inóculo, a un fermentador agitado de 4 litros que contiene 2 litros del siguiente medio de producción:

	<u>Ingredientes</u>	<u>g/litro</u>
	Glucosa	110
	Licor de infusión de maíz	0,5
10	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,58
	KH_2PO_4	1,5
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	Urea	0,5
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mg
15	Acido nicotínico	300

pH 6,0.

La fermentación se realizó a una temperatura de unos 28°C agitando a 1700 rpm y aireando a un caudal de 0,75 volúmenes por volumen de caldo por minuto. Después de un periodo de fermentación de unas 20 horas, se agregó glucosa estéril (55 g/litro). El pH se mantuvo a 5,5 mediante adición de una solución de hidróxido sódico. se prosiguió la fermentación hasta que se obtuvo un rendimiento de ácido 2,5-dicetoglucónico superior al 95 % (calculado sobre la glucosa).

1

EJEMPLO 2

Puede repetirse el método del Ejemplo 1 con resultados comparables empleando Acetobacter cerinus IFO 3266.

5

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10

1. Un procedimiento para la producción de ácido 2,5-dicetoglucónico que consiste en propagar aerobiamente Acetobacter cerinus en un medio de glucosa y después recuperar el ácido 2,5-dicetoglucónico resultante o procesar el caldo de fermentación mediante reducción selectiva para formar los ácidos 2-cetogulónico y 2-cetoglucónico.

15

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde la concentración de glucosa en el medio es del 2,5 al 20 %, la temperatura de fermentación es de 20 a 35°C, el pH inicial es de 3,5 a 7,5 y el pH en el transcurso de la fermentación se mantiene alrededor de 5,5.

20

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 o 2, donde el Acetobacter cerinus es la cepa IFO 3263.

4. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 o 2, donde el Acetobacter cerinus es la cepa IFO 3266.

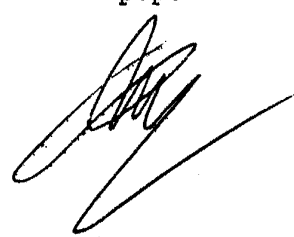
25

5.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 2,5-DICETO-
GLUCONICO.

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente Memoria descriptiva que consta de nueve páginas meca-
nografiadas.

Madrid 17 de Noviembre 1.978

BERNARDO UNGRIA
p.p.



5

10

15

20

25

