

P.- 42.054

368661

Nº 80186
Case D-4126
U.S. Serial Nº 666.979

368661

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE <u>C-12</u>
SUBCLASE <u>B</u>



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CPC INTERNATIONAL INC.

entidad / ~~Estados Unidos~~ norteamericana

con domicilio en Internacional Plaza, Englewood Cliffs,
Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

por: "UN METODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION DE ISOMERASA
DE GLUCOSA" (Clase Internacional C 13 k)

5.7.71

-1-

**POOR
QUALITY**



La presente invención se refiere a un método para producir una preparación de enzima de isomerasa de glucosa y con un método para isomerizar glucosa en fructosa poniendo en contacto la glucosa con una preparación de enzima.

5

Más específicamente, la presente invención proporciona un método para producir una preparación de enzima de isomerasa de glucosa que incluye isomerasa de glucosa de origen extracelular, que comprende desarrollar, en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono apropiada, un microorganismo del género Streptomyces capaz de producir la preparación de enzima citada y permitir que la preparación de enzima de isomerasa de glucosa se forme mediante el microorganismo.

10

15

La invención proporciona asimismo un método para preparar levulosa isomerizando glucosa que comprende producir una preparación de enzima de isomerasa de glucosa que tiene actividad enzimática de origen extracelular desarrollando en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono apropiada, un microorganismo del género Streptomyces que es capaz de producir la preparación de enzima, y sometiendo la glucosa a la acción de la preparación de enzima. La isomerización de glucosa mediante la acción de álcali acuoso se ha conocido desde hace mucho tiempo. Los catalizadores tales como hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonatos de metal alcalino térreo, intercambiadores de iones alcalinos, amoníaco, piridina, etc., se han utilizado para isomerizar la glucosa. Sin embargo, los rendimientos de la fructosa formada de esta manera, ascienden hasta aproximadamente de

20

25

30

368661

21



20 a 30 por ciento como máximo, haciendo el procedimiento extremadamente poco atractivo desde un punto de vista comercial. Nuevamente, el aislamiento de la fructosa a partir de la mezcla de reacción, si se desea, puede efectuarse sólo con gran dificultad y con pérdidas considerables, haciendo el proceso total aún menos industrialmente factible.

En los intentos de mejorar el procedimiento anteriormente citado, se han propuesto un número de métodos de isomerización de glucosa que involucran la acción de enzima. Estos métodos propuestos se han encontrado inaceptables comercialmente debido a una o más razones de rendimiento insatisfactorio, orden de reacción lento, dificultad para obtener la preparación de enzima deseada, incapacidad para recuperar de manera eficiente el componente de fructosa, si se desea, etc. En particular, los procedimientos enzimáticos de este tipo anteriormente, han involucrados todos ellos el sistema de enzimas prácticamente intracelulares. Es decir, el medio de cultivo empleado, sólo contiene la enzima dentro de la célula del organismo, o intensamente adherente al mismo. Aún cuando las células, pueden desintegrarse artificialmente para producir una fuente de enzima extracelular, por ejemplo desintegrándolas con un desintegrador sónico o supersónico, este paso extra requiere demasiado tiempo y algunas veces es difícil de llevar a cabo y conduce a costos de producción totales materialmente aumentados en el método de isomerización.

En vista de lo anteriormente expuesto, sería extremadamente ventajoso producir una preparación de enzima de isomerasa de glucosa que tenga un alto grado de activi-

368661



dad de enzima extracelular. Si puede lograrse este tipo de actividad directamente sin recurrir a un paso molesto añadido de desintegración de célula, dicho descubrimiento sería un avance material en el arte. Se prefiere grandemente que la preparación de enzima posea un alto grado de actividad de enzima extracelular, debido a un número de razones. Por ejemplo, se cree por lo general que las enzimas intracelulares actúan más lentamente en su papel específico en comparación con la clase extracelular. Los materiales de enzima extracelulares, por lo general se cree que son más activos tanto para lograr un mayor grado de isomerización así como para rendir este alto porcentaje en considerablemente menos tiempo en comparación que la utilización de las fuentes intracelulares. De manera más importante, teóricamente hay una menor limitación en cuanto a la cantidad de enzima extracelular que puede producir un organismo. Por otra parte, la cantidad de enzima intracelular presente desde luego depende de la cantidad de las células del organismo presentes, tal y como se crean biológicamente. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha encontrado en el arte una preparación de enzima de isomerasa de glucosa que sea de caracter enteramente extracelular o aún una preparación que tenga un alto grado de actividad de enzima extracelular además de ser del tipo intracelular.

5

10

15

20

25

30

En vista de lo anteriormente expuesto, la ventaja principal de la invención es la de que proporciona una preparación de enzima de isomerasa de glucosa, caracterizada como teniendo un alto grado de actividad de enzima extracelular.

368661



Una ventaja relacionada de la invención es la de que proporciona un método para producir el sistema de enzima justamente descrito.

5 Una ventaja específica de la invención es la de que el método anteriormente citado para producir la enzima de isomerasa de glucosa desarrollando un microorganismo apropiado en un medio de cultivo específico, da por resultado un alto rendimiento de enzima en comparación con los métodos semejantes que utilizan otras fuentes de carbono en el medio de cultivo.

10 Todavía otra ventaja de la invención es la de que proporciona un método para isomerizar glucosa en fructosa mediante el empleo de la preparación de enzima justamente descrita.

15 Una ventaja todavía adicional de la invención es la de que el método de isomerización anteriormente citado puede adaptarse para trabajar con altas concentraciones de substrato de glucosa y asimismo proporciona rendimientos excelentes de fructosa en un período de tiempo relativamente corto.

20 Todavía otra ventaja de la invención es la de que el método de isomerización de glucosa es capaz de producir fructosa en cantidades que llegan al límite teórico requeridas por consideraciones de equilibrio.

25 Otras ventajas aparecerán a continuación.

De acuerdo con la invención, se ha descubierto una nueva preparación de enzima de isomerización de glucosa. Hablando en términos generales, esta preparación de enzima es una preparación de enzima de isomerasa de glucosa, extracelularmente derivada.

368661



La invención está también encaminada a una preparación de enzima de isomerasa de glucosa derivada de un fluido de cultivo que tiene una proporción considerable de actividad de isomerasa extracelular. La invención está particularmente involucrada con una preparación de enzima de isomerasa de glucosa derivada únicamente de la porción extracelular del fluido de cultivo de un organismo formador de isomerasa de glucosa. Las preparaciones de enzima de isomerasa de glucosa grandemente preferidas de este tipo, se derivan de microorganismos tales como de la especie Streptomyces venezuelae.

Mediante el término "extracelularmente derivada", se quiere dar a entender que en el fluido de cultivo una porción considerable de la actividad de isomerasa de glucosa, se acumula dentro del líquido que rodea las células para distinguirse de la actividad dentro de las células mismas. La actividad de la enzima extracelularmente derivada puede separarse fácilmente de la actividad celular mediante filtración u otras técnicas sencillas. La actividad de la enzima intracelularmente derivada, por otra parte, es aquella que se encuentra dentro de las células. Para liberar y acumular esta actividad se deben romper las membranas de la célula ya sea mediante procedimientos disruptivos físicos o químicos.

Hablando en términos generales, el método para producir el sistema de enzima anteriormente citado, comprende los pasos de desarrollar en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono apropiada, cierto organismo que sea capaz de producir esta enzima y luego permitir que la enzima se forme mediante el citado organismo. El

368661

16.7.69



organismo puede derivarse de una fuente de planta, animal o cereal, y ser de caracter microscópico. Se prefiere grandemente que la enzima protéica se produzca utilizando un microorganismo del tipo bacteriano o fungoso.

5 Son particularmente apropiados en el método anteriormente propuesto los miembros del género Streptomyces. Las especies particularmente preferidas entre estos géneros son Streptomyces venezuelae y Streptomyces olivochromogenes. Los cultivos de una cepa de cada uno de estos
10 organismos se han depositado en la colección de cultivo de tipo americano, en Washington, D.C., E. U. A., y se han añadido a su colección permanente de microorganismos. Se han asignado de las siguientes designaciones: Streptomyces Venezuelae: ATCC Nº. 21113; Streptomyces olivochromogenes:
15 ATCC Nº. 21114. Se ha encontrado que utilizando estas cepas u otras, se puede obtener una enzima de isomerasa de glucosa útil, que tiene actividad de enzima intracelular no obtenible hasta ahora con respecto a una clase de enzima que tiene este tipo de actividad de glucosa de isomeri-
20 zación.

La invención está también ampliamente relacionada con un método para preparar fructosa isomerizando glucosa. Los pasos involucrados en este aspecto de la invención incluyen el paso justamente descrito de producir la
25 enzima de isomerasa de glucosa extracelular y luego sometiendo la glucosa a la acción de la preparación de enzima.

La enzima deseada se prepara de la manera usual. Un inóculum preparado por ejemplo sobre un cultivo en tubo inclinado de agar, se usa para inocular un matraz que
30 tiene un medio o un nutritivo apropiado. De esta manera,

368661



por ejemplo, un cultivo que contiene una especie de Streptomyces, capaz de producir una preparación de enzima extracelular de isomerasa de glucosa se utiliza para inocular un substrato que contiene una fuente de carbono apropiada.

5 Aquí, el organismo se permite que se desarrolle y produzca la enzima deseada. El período de incubación puede variar a través de una amplia escala de tiempo dependiendo del microorganismo específico involucrado, así como del medio de cultivo específico utilizado. Por lo general, el

10 período de incubación puede durar de aproximadamente 4 a aproximadamente 48 horas. En el caso usual, se utiliza luego una alícuota o un organismo en masa completo para inocular un volumen mayor del nutritivo. Esto puede repetirse uno o más veces. El cultivo final, con o sin procedimientos de purificación, se usa para llevar a cabo la

15 isomerización de glucosa en fructosa.

De esta manera, se puede usar el medio total directamente como una fuente de isomerasa de glucosa, o el medio puede filtrarse o tratarse de otra manera. El material filtrado o centrifugado usualmente contiene la preparación de enzima extracelular, que luego puede utilizarse

20 directamente o purificarse adicionalmente mediante un número de métodos conocidos. Asimismo, la fracción intracelular, que usualmente queda como una masa celular sólida, puede descartarse o emplearse separadamente en el paso de

25 isomerización de glucosa. Debido a razones de economía, normalmente se utiliza el medio total sin separación adicional, cuando se está llevando a cabo la isomerización a escala industrial considerable.

30 En la práctica usual de la invención, se atribuye

368661



el 20 por ciento de la actividad de la enzima de isomerasa de glucosa total hasta aproximadamente 60 por ciento o mayor a la fuente de enzima extracelular.

5 Debe observarse que no todas las especies o cepas de Streptomyces, son activas aquí para producir una preparación de enzima de isomerasa de glucosa, que tenga por lo menos una actividad de enzima extracelular. Sin embargo, la invención no queda limitada al uso de ningún organismo ni microorganismo específicos, siempre y cuando
10 el organismo tenga la capacidad de producir una preparación de enzima caracterizada porque contiene por lo menos una fuente de enzima extracelular que tiene actividad para isomerizar la glucosa en fructosa. Como se ha manifestado en lo que antecede, dichas preparaciones de enzima han sido hasta ahora desconocidas en el arte.
15

En otra modalidad de la invención, se ha descubierto una fuente de carbono o nutritivo particularmente apropiado que puede usarse para producir las preparaciones de enzima anteriormente descritas. Esta fuente de carbono
20 es una mezcla de xilosa y almidón que puede usarse como la única fuente de carbono o en combinación con una variedad de otras fuentes de carbono, tales como de manitol, ácido glucónico, galactosa, glicerina, sorbitol, glucosa y otras fuentes de carbohidratos puras o impuras. Como se verá a
25 continuación, esta mezcla de xilosa y almidón como un conjunto es mejor como un medio de cultivo que cualesquiera de los dos componentes o de una base de dosificación igual. La mezcla de nutritivo crea particularmente una preparación de enzima más activa de la xilosa que se ha usado ampliamente como una fuente de carbono para preparar una enzima de
30

16.7.69

368661



isomerasa de glucosa. De nuevo, el almidón solo, como una fuente de carbono, no es apropiado en la presente.

5 El nutritivo de almidón que se usa para llevar a la práctica la invención puede derivarse de cualquier fuente vegetal, tal como por ejemplo de maíz, trigo, papa, tapioca, arroz, sagú y grano de sorgo. Los almidones para-
10 rafinosos pueden también usarse. El término "almidón" se usa ampliamente en la presente, y abarca el almidón no mo-
15 dificado y los residuos asimismo, el almidón que se ha mo-
dificado mediante tratamiento con ácidos, álcali, enzimas o agentes oxidantes. Los almidones modificados solubles o parcialmente solubles, las dextrinas, los productos pre-
20 gelatinizados y los derivados de almidón tales como ciertos materiales derivados de almidón catiónicos, aniónicos y no iónicos, son también apropiados en la presente. Los almidones típicos útiles en la presente son de maíz y de papa.

La porción de xilosa del material puede ser la xilosa misma, o sus formas naturales que existen en las
20 paredes de la célula de casi cualesquiera de las plantas en la forma de un polímero de xilán, conteniendo azúcar de xilosa como un constituyente principal. Por lo tanto, la xilosa puede usarse tal y como está presente en una
25 forma impura en paja, granza, madera, mazorcas de maíz, salvado de trigo, y etc. Usualmente los materiales anteriores y otros materiales se tratan con álcali para extraer la hemicelulosa de los distintos materiales de pulpa de
30 desperdicio que se usan como el medio. A fin de obtener la xilosa de monosacárido, se hidroliza por lo general la hemicelulosa. Por lo tanto, mediante el término "xilosa",

368661



tal y como se usa en la presente, se quiere dar a entender como incluyendo el material puro así como las fuentes impuras que contienen este carbohidrato.

5 En una práctica preferida, la mezcla de carbono usualmente se compone de 25 a 75 por ciento de almidón, y del 25 al 75 por ciento de xilosa, basándose únicamente en el peso total de la mezcla de la fuente de carbono. Expresado de manera diferente, la fuente de carbono que consiste de xilosa y almidón, usualmente comprende de 0,2 a 10
10 por ciento en peso del medio de cultivo y más frecuentemente de 0,5 a 2 por ciento en peso del medio.

En todavía otra modalidad de la invención, un medio de cultivo particularmente descado contiene un licor de maíz macerado como una fuente de proteínas. Esta combinación, además de la mezcla justamente descrita de xilosa y la fuente de almidón, es especialmente deseable.
15 Usualmente el licor de maíz macerado compuesto de varios aminoácidos consiste de 0,1 por ciento a 5,0 por ciento en peso, basado en el peso total del medio de cultivo.

20 Al preparar las enzimas de la invención se comprenderá que el medio de siembra y los medios de crecimiento de células subsecuentes, pueden también contener además de aquellas fuentes de carbono anteriormente descritas u otras, una fuente de nitrógeno apropiada, sales inorgánicas, tales como sulfato de magnesio, fosfato de dihidrógeno de potasio, etc., y otros materiales, tal y como sea deseable. Usualmente el cultivo tal como Streptomyces venezuelae
25 se desarrolla a un pH que varía de aproximadamente 7 a 9, a temperatura de aproximadamente 20° C., a aproximadamente 40°C.
30

368661



De nuevo, el paso de isomerización real, dependiendo de la fuente de la preparación de enzima, la concentración de la glucosa, la temperatura, la presencia o ausencia de cofactores de enzima, etc., puede variar en el tiempo requerido para llegar a los rendimientos máximos de fructosa. En el caso usual, se obtienen rendimientos apropiados en un tiempo que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 36 horas. Durante este paso, la temperatura puede ser temperatura ambiente, o puede ser temperatura elevada digamos temperatura de aproximadamente 50° a 70° C. Por lo general, el pH del sistema de glucosa que experimenta la isomerización, se mantiene a aproximadamente 7 a 9, mediante el uso de un sistema estabilizador apropiado, tal como un estabilizador de fosfato. Pueden también estar presentes otros activadores, tales como magnesio o manganeso. Puede ser posible, en ciertos casos, reducir al mínimo las reacciones secundarias, mediante la adición de inhibidores, tales como arsenato de sodio, arsenita de sodio, y fluoruro de sodio. Se observará que la actividad de la enzima se aumenta hasta un máximo mediante el uso de un cofactor de enzima tal como cobalto en la forma de una sal de cloruro de cobalto.

La glucosa misma usualmente está presente en forma de solución concentrada. Se han observado resultados excelentes cuando la concentración de la glucosa es de 0,5 a 5,0 molar. Se comprenderá que pueden también isomerizarse fuentes de glucosa más diluídas, así como soluciones aún supersaturadas.

Los siguientes ejemplos ilustrarán las facetas típicas de la invención. Quedará comprendido, desde luego

368661



que los se presentan para fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse en un sentido de limitación. Todas las referencias a las partes y los porcentajes son en peso a no ser que se indique expresamente lo contrario.

5

EJEMPLO I

Aquí, se prepararon unas preparaciones de enzima de isomerasa de glucosa extracelular a partir de dos especies, a saber, S. venezuelae, ATCC N^o. 21113, y S. *Olivochromogenes*, ATCC N^o 21114, y las preparaciones de enzima se utilizaron para isomerizar muestras de glucosa.

10

El medio de cultivo usado en este experimento estaba compuesto de lo siguiente:

	Xilosa	0,5	g.
15	Almidón de papa solubilizado	0,5	g.
	Peptona	1,0	g.
	Extracto de carne	0,5	g.
	Extracto de levadura	0,25	g.
	Cloruro de sodio	0,5	g.
20	Sulfato de magnesio	0,05	g.
	Cloruro de cobalto	0,005	g.

El pH del medio de cultivo se ajustó hasta aproximadamente 7,0 antes de la incubación.

Después de esterilizarse y enfriarse a temperatura de 25^o C., muestras de 100 mililitros del medio de xilosa y almidón anteriormente citados se inocularon con las especies justamente mencionadas. Las inoculaciones se llevaron a cabo específicamente inoculando el medio con tres porciones de células de los cultivos en tubo inclinado de agar de xilosa y almidón.

30

366661



Después de 48 horas de incubación a temperatura de 28° C., en un agitador para aerear el cultivo, las células se cosecharon centrifugando el medio de cultivo a 10.000 revoluciones por minuto, durante 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con una solución salina al 0,85 por ciento y se suspendieron en 5 mililitros de una solución estabilizadora de fosfato de 0,05 molar (pH de 7,5). La suspensión de la célula luego se trató en un oscilador sónico enfriado con agua durante 20 minutos a 10 kilociclos, y luego se centrifugó de nuevo a 12.000 revoluciones por minuto durante 30 minutos. El fluido sobrenadante se usó como una fuente cruda de una solución de enzima de isomerasa de glucosa intracelular.

La isomerasa de glucosa extracelular cruda se preparó añadiendo 50 mililitros de un material centrifugado de cultivo con sulfato de amonio a saturación del 60 por ciento. Después de centrifugación, la solución de enzima extracelular parcialmente purificado se obtuvo disolviendo el material precipitado en 4 mililitros de una solución estabilizadora de fosfato de 0,05 molar (pH de 7,5) y dializando la solución contra el estabilizador durante un día a temperatura de 5° C.

La isomerización misma se llevó a cabo preparando una solución acuosa de 1,6 molar de glucosa que también contenía un estabilizador de fosfato de 0,05 molar, un sulfato de magnesio de 0,2 molar, y un cloruro de cobalto de 0,05 molar. 2 mililitros de las soluciones de enzima anteriormente descritas, se añadieron a 2 mililitros de solución de glucosa.

Después de la incubación durante tres horas a

368661



5 temperatura de 60° C., se retiraron 0,5 mililitros de la mezcla de reacción en 4,5 mililitros de una solución de ácido perclórico de concentración 0,5 Normal. La cantidad de fructosa formada en la alícuota se determinó mediante el método de cisteína y carbazol, tal y como se describe en el Diario de la Química Biológica, 192, 583 (1951). En esta prueba se desarrolló la intensidad del color durante 10 minutos a temperatura de 60° C., después de la adición de los reactivos. La intensidad luego se leyó en un espectrómetro a 560 milimicrones y la cantidad de fructosa presente se calculó de las normas. Los resultados se proporcionan de la siguiente manera. Las actividades de la enzima se calcularon para demostrar la actividad por mililitro del licor de cultivo original.

10

15

368661



CUADRO I

<u>Micro- orga- nismo</u>	<u>Actividad de isomerasa de glucosa intra- celular</u>			<u>Actividad de isomerasa de Glucosa extracelular</u>		
	<u>% de fruc- tosa forma- da</u>	<u>mm. de fructo- sa por ml. de licor de cul- tivo</u>	<u>% de fructo- sa por ml. de licor de cul- tivo</u>	<u>% de fructo- sa for- mada</u>	<u>mg. de fructosa por ml. de licor de cul- tivo</u>	<u>% de fruc- tosa por ml. de li- cor de cultivo</u>
<u>S. olivo chromo- genes</u>	38,9	5,6	0,97	5,6	1,3	0,22
<u>S. Vene- zuelae</u>	37,5	5,4	0,94	24,8	5,8	0,99

368661



EJEMPLO II

5 Aquí, el efecto del período de cultivo en la actividad de isomerasa del S. venezuelae ATCC Nº. 21113 se estudió. El medio de cultivo y las otras condiciones eran iguales que aquellas descritas en el Ejemplo I con la excepción de que se añadieron 10 mililitros del caldo de precultivo como un inóculum a 100 mililitros de la mezcla de cultivo principal. Luego tanto la célula como el filtrado del cultivo se cosecharon después de 16, 20, 24, 48, 10 72 y 168 horas, de incubación respectivamente, y se utilizaron como las soluciones de isomerasa de glucosa. Los resultados se presentan en el Cuadro II.

15 Como es evidente, la actividad de enzima intracelular de S. venezuelae demostró actividad máxima después de sólo 16 horas de cultivo y mantuvo esta actividad a un nivel prácticamente constante durante más o menos 7 días. La actividad de la enzima de isomerasa de glucosa extracelular de S. venezuelae, aumentó gradualmente y se mantuvo 20 casi constante después de aproximadamente dos días. De esta manera se verá que una especie considerablemente preferida productora de enzima S. venezuelae, para fines de la presente invención, debido a la actividad excelente para producir tanto cantidades considerables de actividad de 25 enzima derivada extracelularmente como intracelularmente.

368661

POOR
QUALITY



CUADRO II

Período de cultivo (ins.)	Actividad de enzima de isomerasa de glucosa intracelular	Actividad de enzima de isomerasa de glucosa extracelular
Micro-organismo	Actividad de glucosa intracelular	Actividad de glucosa extracelular
	% de fructosa por ml. de medio de cultivo	% de fructosa por ml. de medio de cultivo

Micro-organismo	Actividad de glucosa intracelular	Actividad de glucosa extracelular
	% de fructosa por ml. de medio de cultivo	% de fructosa por ml. de medio de cultivo
16	39,3	5,6
20	-	-
24	39,9	5,7
40	36,4	5,2
72	30,0	5,5
168	30,0	5,5

M. venezuelense

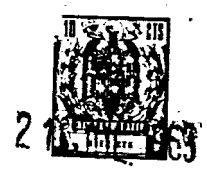
308661

308661

CUADRO II

Micro- organismo	Período de cul- tivo(hrs.)	Actividad de Enzima de Isomerasa de glucosa intracelular			Actividad de de glucosa e	
		% de fruc- tosa for- mada	mg. de fructosa por ml. de medio de culti- vo	% de fruc- sa por ml. de medio de cultivo	de fructo- sa	mg. fru- cto- fru por med cut vo
<u>S. venezue- lae</u>	16	39,3	5,6	0,96		7,0
	20	-	-	-		11,0
	24	39,9	5,7	1,0		17,3
	48	36,4	5,2	0,91		19,6
	72	38,0	5,5	0,95		19,7
	168	38,0	5,5	0,95		16,0

368001



CUADRO II

Actividad de enzima de isomerasa
de glucosa extracelular

Actividad de enzima de isomerasa celular	% de fructosa	mg. de fructosa por ml. de medio de cultivo	% de fructosa por ml. de medio de cultivo
------------------------------------------	---------------	---------------------------------------------	-------------------------------------------

0,98	17,0	1,6	0,28
-	11,0	2,5	0,44
1,0	17,3	4,0	0,69
0,91	19,6	4,5	0,76
0,95	19,7	4,5	0,79
0,95	16,0	3,7	0,54

368661

POOR QUALITY



EJEMPLO III

Aquí, se estudió el efecto de la fuente de carbono en la producción de enzima. En un medio de cultivo se usó 1,0 por ciento de xilosa. En otro se utilizó 0,5 por ciento de xilosa y 0,5 por ciento de almidón de papa. Como puede verse del Cuadro que se da a continuación, los medios que contienen almidón y xilosa indujeron una actividad de formación de fructosa más elevada en comparación con la xilosa y particularmente con respecto a la inducción de actividad de enzima de isomerasa de glucosa intracelular.

CUADRO III

Microorganismo	Fuente de carbono	Glucosa Intracelular	Glucosa Extracelular	
		Actividad de enzima de isomerasa	Actividad de enzima de isomerasa	
		% de fructosa formada	% de Fructosa formada	
15	<u>S. venezuelae</u> , ATCC Nº 21113	Xilosa-almidón	39,3	5,0
20	<u>S. venezuelae</u> , ATCC Nº 21113	Xilosa	24,5	3,5
25	<u>S. olivochromogenes</u> , ATCC Nº 21114	Xilosa-almidón	26,6	-
30	<u>S. olivochromogenes</u> , ATCC Nº 21114	Xilosa	14,9	-

368661

21 JUN



No se comprende enteramente el efecto específico del almidón en la producción de fructosa, cuando se usa como un medio de cultivo. Sin embargo, la teoría es de que el almidón induce o activa hasta cierto grado el crecimiento o desarrollo del microorganismo y consecuentemente, aumenta la actividad de enzima resultante.

EJEMPLO IV

En una serie adicional de estudios, se siguió la actividad productora de enzima de S. venezuelae a través de varios períodos de cultivo. Como se muestra a continuación, la actividad de isomerasa de glucosa intracelular se mantuvo de nuevo a un nivel prácticamente constante, aún después de siete días. La actividad de enzima extracelular de esta especie aumentó a través del período de crecimiento o desarrollo y llegó a un máximo constante después de aproximadamente 5 días de cultivo. Puesto que durante este período de tiempo la actividad de enzima intracelular no disminuyó en proporción, esto señala particularmente el hecho de que la actividad extracelular no se originó de la actividad de enzima intracelular liberada a través de la autólisis de las células.

Al llevar a cabo estos estudios se usaron los siguientes medios de desarrollo para el cultivo de S. venezuelae ATCC Nº 21113. La adición de licor de maíz macedado al medio que contenía xilosa y almidón como una fuente de nitrógeno pareció que acentuaba adicionalmente la isomerización de la glucosa.

La composición de dos medios de cultivo que se

16.7.69

- 20 368661

21 JUN



emplearon es la siguiente:

	<u>Licor de Maíz macerado</u>	<u>Medio-g</u>	<u>Licor no Conteniendo maíz macerado</u>	<u>Medio-g</u>
5	Xilosa	0,5	Xilosa	0,5
	Almidón de papa	0,5	Almidón de papa	0,5
	Licor de maíz macerado	1,0	Peptona	1,0
	Peptona	0,5	Extracto de carne	0,5
	Extracto de carne	0,5	Extracto de levadura	0,25
10	Extracto de levadura	0,25	Sulfato de magnesio	0,05
	Sulfato de magnesio	0,05	Cobalto	0,0024
	Cloruro de cobalto	0,0024		
15				

El pH del medio anteriormente citado era de 7,2 en ambos casos.

Los Cuadro IV y V que se dan a continuación muestran los resultados de estos distintos estudios. El Cuadro IV se relaciona con la actividad de la enzima de S. venezualae que se deriva de un medio de cultivo que contiene licor de maíz macerado. El Cuadro V muestra una actividad semejante derivada de un medio de licor que no contiene maíz macerado tal y como se da a conocer en lo que antecede. Se obtuvieron resultados ligeramente superiores, cuando el licor de maíz macerado formó parte del medio nutritivo.

368661

16.7.69



CUADRO IV

	Tiempo 16	20	24	30	2	3	5	7	10
	<u>hr</u>	<u>hr</u>	<u>hr</u>	<u>hr</u>	<u>días</u>	<u>días</u>	<u>días</u>	<u>días</u>	<u>días</u>
pH	7,1	7,5	8,0	7,9	8,4	8,4	8,8	8,9	9,0
Actividad de enzima intracelular % de fructosa formada	44,4	43,8	45,9	40,8	43,8	42,9	45,2	45,2	30,2
Actividad de enzima extracelular % de fructosa formada	4,4	9,6	8,9	9,5	13,9	13,9	17,8	16,8	15,1

368661

21



CUADRO V

	Tiempo 16	20	24	30	2	3	5	7	10
	<u>hr</u>	<u>hr</u>	<u>hr</u>	<u>hr</u>	<u>días</u>	<u>días</u>	<u>días</u>	<u>días</u>	<u>días</u>
PH	7,3	7,6	7,75	8,1	8,2	8,4	8,6	9,0	9,0
Actividad de enzima intracelular, Porcentaje de fructosa formada	39,3	40,3	41,2	37,0	40,3	40,8	32,2	40,3	34,5
Actividad de enzima extracelular, porcentaje de fructosa formada	3,2 -	4,3	5,4	5,0	11,6	14,6	13,4	8,0	

368661



EJEMPLO V

De nuevo, se utilizaron varias fuentes de carbono para preparar una enzima de isomerasa de glucosa, en este caso, una preparación de enzima de isomerasa de glucosa intracelular. Como puede verse de los datos que se presentan en el Cuadro VI, la mezcla nutritiva de xilosa y almidón era definitivamente superior para producir preparaciones más activas de enzima de isomerasa de glucosa en comparación con la xilosa o almidón solos, como un medio nutritivo.

CUADRO VI

<u>Microorganismo</u>	<u>Fuente de</u> <u>Carbón*</u>	<u>% de fruc-</u> <u>tosa</u>	<u>Mg. de enzima</u> <u>por ml. de</u> <u>mezcla de</u> <u>reacción</u>
<u>S. venezuelae</u> <u>ATCC Nº 21113</u>	Xilosa-almidón (Mezcla con % en peso de 50-50)	35,5	12,5
"	Xilosa	9,2	6,8
"	Almidón	0	5,9
"	Glucosa	0	13,5

* Cantidad total del nutritivo empleado igual en todos los casos.

EJEMPLO VI

Aquí se estudió un número de variables con respecto a la producción de la preparación de enzima de isomerasa de glucosa, extracelular e intracelular a través de la especie de S. venezuelae ATCC Nº 21113.

Primero, se estudiaron las actividades de enzima

21 JUN 1969



extracelular e intracelular con respecto al efecto del pH. La reacción de conversión del tipo extracelular llegó a un óptimo a un valor de pH de aproximadamente 9,0. La actividad intracelular también era al óptimo a un valor de pH de aproximadamente 9,0.

Asimismo se llevaron a cabo varios experimentos para ver qué efecto tenía la temperatura en las actividades de las enzimas tanto extracelular como intracelular de S. venezuelae para activar la conversión. La actividad intracelular aumentó linealmente a través de una escala de temperatura de 40° C., hasta aproximadamente 70° C., a través de períodos de tiempo de reacción tanto como de 1 como 3 horas. El óptimo se encontró que era aproximadamente a 70° C. En el caso de 1/2 hora de tiempo de reacción la temperatura óptima era de 80° C. Si el tiempo de reacción es mayor de aproximadamente 1 hora, la actividad intracelular disminuye por encima de una temperatura de aproximadamente 70° C. Se observó el mismo efecto de la temperatura en la actividad extracelular con la excepción de que la inactivación ocurrió a una temperatura ligeramente más alta.

En otro grupo de estudios, se trató glucosa en concentraciones de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 y 4,0 moles mediante enzimas de isomerasa de glucosa, tanto extracelulares como intracelulares de la especie S. venezuelae. Se encontró que aún a la concentración extremadamente alta de 4,0 moles de glucosa por litro, casi a una condición de solución saturada, ambas reacciones de enzima extracelular e intracelular, avanzaron y se aproximaron al equilibrio teórico a medida que se prolongó el período de reacción. Por

16.7.69

368661



lo tanto puede verse que la invención estaba adaptada para isomerizar aún soluciones de glucosa altamente concentradas, prestando a la misma mayor atractivo en términos de un procedimiento comercialmente factible.

5 En todavía otra serie de estudios, la reacción de isomerización se llevó a cabo durante un período de tiempo relativamente prolongado a fin de determinar un punto de equilibrio aproximado, con respecto a la interconversión utilizando una enzima intracelular de la especie S. venezuelae, alcanzando el contenido de fructosa aproximadamente 48 por ciento de azúcar añadida a partir de la glucosa. Por otra parte, cuando la fructosa era el substrato, el contenido de fructosa final era de aproximadamente 50 por ciento. Por lo tanto parece ser que el punto de equilibrio es en la proximidad de más o menos 48 a 50 por ciento de interconversión.

EJEMPLO VII

20 Se descubrió durante las investigaciones en el laboratorio que aún cuando un número de especies de Streptomyces no exhiben una actividad de isomerasa de glucosa derivada extracelularmente, un cierto número sorprendente no poseía actividad de enzima de isomerasa de glucosa extracelularmente derivada. Se llevaron a cabo pruebas tal y como se señala por lo general en el Ejemplo I, sobre un número considerable de especies de Streptomyces. Los resultados con respecto a unas cuantas de ellas se enuncian a continuación.

30

368661



CUADRO VII

Actividad de isomerasa de glucosa extracelular

Microorganismo	Actividad de isomerasa de glucosa extracelular		
	mg. de fructosa por ml. de licor de cultivo	mg. de fructosa por ml. de licor de cultivo.	
5	<u>S. aureus</u>	0	0
	<u>S. flaveolus</u>	0	0
	<u>S. coelicor</u>	0	0
10	<u>S. parvus</u>	1,4	0,24
	<u>S. roseochromogenus</u>	0	0
	<u>S. purpurascens</u>	0	0
	<u>S. scabies</u>	1,3	0,23
	<u>S. vinaceus</u>	1,6	0,28
15	<u>S. tanashiensis</u>	1,9	0,33

Aún cuando la invención se ha descrito en relación con modalidades específicas de la misma, quedará comprendido que es capaz de modificación adicional y esta solicitud se destina a amparar cualesquiera de las variaciones, usos, o adaptaciones de la invención, siguiendo por lo general los principios de la invención, e incluyendo tales desviaciones de la exposición presente, que queden dentro de la práctica conocida o acostumbrada en el arte, al cual se relaciona la invención y tal y como pueden aplicarse a las particularidades esenciales dadas a conocer en lo que antecede, y quedando dentro del alcance de la invención y de los límites de las cláusulas anexas.

368661



14 JUN

REIVINDICACIONES

5 Los puntos de invención, propia y nueva,
que se presentan para que sean objeto de esta solicitud
de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son
los siguientes:

10 1.- Un método para producir una prepara-
ción de isomerasa de glucosa que incluye actividad de en-
zima extracelular por cría de microorganismos, caracteri-
zado por desarrollar microorganismos, en un medio que con-
tiene xilosa y/o un material que suministra xilosa de una
especie particular de Streptomyces capaz de producir dicha
isomerasa de glucosa extracelular y usar el producto de
15 cultivo así producido, como un todo o después de la prepa-
ración de las células y/o partes de células, como prepara-
ción de enzima formada por dicho microorganismo.

20 2.- El método según la reivindicación 1,
caracterizado por desarrollar el microorganismo de la es-
pecie de Streptomyces en un medio de cultivo que contiene
una mezcla de almidón y xilosa y/o un material que suminis-
tra la xilosa, como fuente de carbono.

25 3.- El método según las reivindicaciones
1 ó 2, caracterizado porque el material que suministra la
xilosa es hidrolizado de xilán.

4.- El método según las reivindicacion-
nes 1, 2 ó 3, caracterizado por utilizar un medio de cul-
tivo que incluye licor de maíz macerado.

30 5.- El método según cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por cultivar la

5.7.71



especie de Streptomyces a un valor de pH dentro de la escala de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 y a una temperatura dentro de la escala de aproximadamente 20^o C. a aproximadamente 40^oC.

5

6.- El método según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por utilizar el microorganismo Streptomyces venezuelae ATCC No. 21113 ó Streptomyces olivochromogenes ATCC No. 21114.

10

7.- Un método para producir una preparación de isomerasa de glucosa.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de veintinueve hojas escritas a máquina por una sola cara

Madrid,

16 Julio 1971

P.A.

360661

5.7.71

- 29 -

A.A.B.