



SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE <u>E 12</u>	_____
SUBCLASE <u>D</u>	_____

Nº 378.525
=====

378525

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: STANDARD BRANDS INCORPORATED

RESIDENCIA: 625 Madison Avenue, NEW YORK, N.Y.,

U.S.A.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO DE DESARROLLO DEL CULTIVO DE MICROORGANISMOS DEL GENERO STREPTOMYCES QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE ASIMILAR EL XILANO PARA PRODUCIR GLUCOSA ISOMERASA".

Prioridad: Patente n.º del

MP/

**POOR
QUALITY**

378525



ABR. 1970

1 Este invento se refiere a un procedimiento mejorado
para cultivar microorganismos que producen glucosa isomera-
sa. En particular, el presente invento se refiere a un pro-
cedimiento mejorado para cultivar microorganismos clasifi-
5 cados como pertenecientes al género Streptomyces que produ-
cen glucosa isomerasa.

 Para los fines de este invento, el sistema utiliza-
do para clasificar los microorganismos de este procedimien-
to es el sistema de clasificación propuesto por el Dr. S.A.
10 Waksman en The Actinomycetes, Vol. 2, 1961, Williams and
Wilkins Company.

 La aplicación principal de la glucosa y de los jara-
bes de maíz que contienen glucosa se encuentra en la trans-
formación de alimentos, por ejemplo en las industrias del
15 horneado, bebidas, conservas y confitería, para comunicar
dulzura, cuerpo o para regular el crecimiento de cristales.
Sin embargo, debido a que la glucosa carece inherentemente
de un alto grado de dulzura y tiene un sabor relativamente
blando, sus aplicaciones están algo limitadas. Esto es supe-
20 rado, hasta cierto punto, mezclando la glucosa o el jarabe
de maíz con sacarosa o con jarabes invertidos para aumentar
la dulzura total. Esto no ha resultado totalmente satisfac-
torio, debido a los factores económicos y de otro tipo im-
plicados. Se ha reconocido que, si durante la producción de
jarabes de maíz, puede convertirse una importante propor-
ción del almidón en fructosa, se obtiene un jarabe de maíz
que es suficientemente dulce para satisfacer otros fines
25 adicionales.

 Se sabe que la glucosa puede ser convertida en fruc-
30 tosa calentando una solución de glucosa en presencia de un



1 catalizador alcalino. El producto isomerizado de este pro-
ceso está generalmente muy coloreado y contiene sustancias
además de la fructosa y de la glucosa que son objetables y
que comunican sabores secundarios indeseables. Se han con-
5 cedido patentes sobre procedimientos que están dirigidos
a mejorar la isomerización alcalina de la glucosa, por ejem-
plo las patentes estadounidenses 2.354.664 y 2.746.889 pero,
que nosotros sepamos, ninguna ha sido explotada comercial-
mente debido, probablemente, a su elevado costo de opera-
10 ción y a la calidad relativamente mala del producto.

Asimismo, se describen en diversas publicaciones los
procedimientos enzimáticos para convertir la glucosa de los
jarabes que la contienen en fructosa. Por ejemplo, en un
artículo aparecido en Science, Vol. 125, pág. 648-649
15 (1957) se describe un procedimiento para convertir la glu-
cosa en fructosa mediante un enzima derivado de Pseudomonas
hydrophila. De acuerdo con este artículo, para obtener glu-
cosa isomerasa a partir de Pseudomonas hydrophila, el mi-
croorganismo debe ser cultivado en presencia de una fuente
20 de carbono compuesta principalmente por D-xilosa. La D-xilo-
sa deriva del xilano, que es el polisacárido más abundante
en el grupo de la hemicelulosa, por hidrólisis ácida o
enzimática. La D-xilosa es un material relativamente caro
y, como el microorganismo Pseudomonas hydrophila requiere
este hidrato de carbono como sustrato para producir gluco-
25 sa isomerasa, se encuentran inconvenientes evidentes asocia-
dos a este proceso. Asimismo, en este procedimiento, para
obtener unos rendimientos adecuados de fructosa, debe en-
contrarse presente durante la isomerización un sistema re-
30 gulador que contenga un arseniato o un fluoruro. Estos sis-

378525



ABR. 1970

1 temas reguladores representan un posible peligro para la
salud si no son eliminados completamente en la refinación
posterior del jarabe. Muchos de los procedimientos descri-
tos en otras publicaciones presentan inconvenientes adicio-
5 nales. Por ejemplo, el cultivo de los microorganismos para
formar cantidades adecuadas de glucosa isomerasa puede re-
querir un tiempo indeseablemente prolongado y/o los rendi-
mientos de la glucosa isomerasa derivada del microorganis-
mo pueden ser tan bajos que los procesos resulten carentes
de atractivo comercial.
10

Existe la necesidad de un método económico y conve-
niente para obtener glucosa isomerasa a partir de un micro-
organismo del género Streptomyces.

De acuerdo con el presente invento, proporcionamos
15 un procedimiento de desarrollo de un cultivo de microorga-
nismos del género Streptomyces que tienen la capacidad de
asimilar el xilano para producir glucosa isomerasa, cuyo
procedimiento consiste en cultivar los microorganismos por
etapas en un medio nutritivo acuoso en condiciones aero-
20 bias sumergidas, encontrándose presente por lo menos en una
de las etapas iniciales del crecimiento una pequeña cantidad
de un material no nutritivo acuoso dispersable que induce
al microorganismo a crecer en forma filamentosa.

El término "no nutritivo, acuoso dispersable" en el
25 sentido utilizado aquí define a un material que es fácilmen-
te suspendible en un medio acuoso mediante una agitación
suave (la agitación normalmente requerida para proporcionar
condiciones aerobias) o es coloidalmente suspendible en un
medio acuoso y no es asimilado por los microorganismos o
30 que no es completamente asimilado por los microorganismos

378525



1970

1 durante el crecimiento de los mismos.

5 Aunque los microorganismos utilizados en el procedimiento del presente invento se caracterizan por tener la capacidad de asimilar el xilano para producir glucosa isomerasa, también asimilarán otros muchos hidratos de carbono para producir glucosa isomerasa. Por ejemplo, asimilarán xilosa, glucosa y fructosa bajo ciertas condiciones y producen glucosa isomerasa. La caracterización de los microorganismos como poseedores de la capacidad de asimilar xilano para producir glucosa isomerasa se utiliza solamente para los fines del presente invento con objeto de diferenciar estos microorganismos de otros que también pueden producir glucosa isomerasa, pero que no lo hacen así cuando la fuente principal de carbono es un xilano.

15 Los xilanos son los polisacáridos más abundantes en el grupo de la hemicelulosa. Aparecen prácticamente en todas las plantas terrenas y en algunas algas marinas. Presentan la máxima abundancia en los cultivos anuales, especialmente en los residuos agrícolas como tucas de maíz, cañas de maíz y cáscaras y tallos de gramíneas, en los que se encuentran en cantidades que oscilan entre 15 y 30 % en peso. También las maderas duras contienen importantes cantidades de xilanos, por ejemplo del orden de 20 a 25 %. Debido a que los xilanos son asequibles fácil y económicamente, una realización preferida del presente invento es aquella en la que el substrato principal utilizado para cultivar los microorganismos en gran escala es un material que contiene xilano, como el salvado de trigo.

25 En los procedimientos comerciales para la propagación de microorganismos, frecuentemente es conveniente pro-

30

378525



179 APR 1970

1 ceder por etapas. Estas etapas pueden ser pocas o muchas,
dependiendo de la naturaleza del proceso y de las carac-
terísticas de los microorganismos. Normalmente, la progra-
mación se inicia inoculando esporas procedentes de un cul-
5 tivo inclinado en un medio nutritivo previamente esterili-
zado, contenido normalmente en un matraz sacudido. En el
matraz se estimula el crecimiento de los microorganismos
por diversos medios, v.g. sacudiéndolo para su aireación y
manteniendo una temperatura adecuada. Esta fase o etapa se
10 repite una o más veces en matraces o vasijas que contienen
volúmenes iguales o mayores del medio nutritivo. Estas eta-
pas pueden ser denominadas convenientemente etapas de desa-
rrollo del cultivo. Los microorganismos procedentes de la
última etapa de desarrollo, con o sin el medio de cultivo
15 que les acompaña, se introducen o inoculan en un fermenta-
dor a gran escala para producir cantidades comerciales de
los microorganismos o de sus subproductos.

Las razones para cultivar los microorganismos en
etapas son múltiples, pero dependen fundamentalmente de las
20 condiciones necesarias para el crecimiento de los microor-
ganismos y/o para la producción de subproductos de los mis-
mos. Estas condiciones son la estabilidad de los microorga-
nismos, agentes nutritivos apropiados, pH, relaciones osmó-
ticas, grado de aireación, temperatura y el mantenimiento
25 de unas condiciones de cultivo puras durante la fermenta-
ción. Por ejemplo, para obtener rendimientos máximos de en-
zimas, es posible que las condiciones de fermentación en la
etapa final tengan que ser algo diferentes de las practica-
das para obtener el crecimiento óptimo de los microorganis-
30 mos en las etapas de desarrollo del cultivo. También el man

378525



ABR. 1970

1 tenimiento de la pureza del medio es una consideración de
 extraordinaria importancia, especialmente cuando la fermenta-
 ción se realiza en condiciones aerobias. Si la fermenta-
5 ción se inicia al principio en un fermentador grande, será
 necesario un periodo de tiempo relativamente largo para con-
 seguir un rendimiento apreciable de microorganismos y/o de
 sus subproductos. Naturalmente, esto aumenta la posibili-
 dad de contaminación del medio y de mutación de los micro-
 organismos. Además, las necesidades de energía para agitar
10 y mantener la temperatura del medio son grandes en compara-
 ción con los utilizados cuando la fermentación se realiza
 en etapas.

 Un ejemplo de un microorganismo preferido utilizado
 en el procedimiento del presente invento ha sido identifica-
15 do como Streptomyces wedmorensis ATCC 21175. La identifica-
 ción del microorganismo como Streptomyces wedmorensis se
 basó en un estudio taxonómico. Los resultados de este es-
 tudio se encuentran a continuación.

Características principales

- 20 1. Micelios aéreos - abundantes, de color gris a gris in-
 tenso.
 2. Morfología de los micelios aéreos - esporoforos linea-
 les; esporas ovales.
 3. Pigmento de melanina - negativo.

25

30

378525



ABR. 1970

1

Propiedades de cultivo

5

<u>Medios</u>	<u>Micelios aéreos</u>	<u>Cultivo sumergido</u>	<u>Pigmento soluble</u>
Agar sacarosa-nitrato	Gris ratón, con bornes blancos	Gris a amarillento	Ninguno
Agar nutritivo	Gris claro a gris intenso	Amarillo a naranja	Ninguno
Agar de Emerson	Blanco cambian- te a gris ratón	Amarillo a naranja	Ninguno
Agar glucosa-patata	Gris	-	-
Trozos de patata	Blanco	Gris, arrugado	Ninguno

10

Propiedades fisiológicas y bioquímicas

1. Gelatina: lenta licuefacción; sin micelios aéreos.
2. Leche: crecimiento verdoso; lenta coagulación y peptonización.
3. Almidón: hidrólisis moderada.
4. Reducción de nitrato: positivo.
5. Producción de H₂S: negativo.

15

Otro microorganismo adecuado del género Streptomyces está identificado como ATCC 21176.

20

En el procedimiento del presente invento, se proporciona una cantidad adecuada de material no nutritivo, acuoso dispersable, en una o más etapas del desarrollo del cultivo. Son ilustrativos de materiales dispersables adecuados el agar, la carboximetilcelulosa y la tierra de diatomeas. Unas pequeñas cantidades de estos materiales mejoran el crecimiento del microorganismo así como el rendimiento de glucosa isomerasa obtenida a partir del mismo.

25

La presencia de los materiales no nutritivos, acuosos dispersables, durante el crecimiento de los microorganismos en condiciones de cultivo sumergidas aerobias produce micelios que son filamentosos. En algunos casos, según

30

378525



1970

1 el tipo de material no nutritivo utilizado, pueden encontrar-
trarse presentes, junto con los micelios de forma filamen-
tosa, una pequeña proporción de micelios en forma de masas
esféricas o gránulos cilíndricos compactos. Cuando estos
5 materiales no se encuentran presentes, los micelios produ-
cidos se encuentran en gran parte en forma de masas esféri-
cas compactas o gránulos cilíndricos. Se prefiere el creci-
miento de tipo filamentosos porque los micelios están dispo-
sados con mayor uniformidad a través del medio nutritivo
10 durante la fermentación y, por lo tanto, están más expues-
tos a la acción de los agentes nutritivos y del oxígeno.
Por lo tanto, debido al crecimiento de tipo filamentosos,
los microorganismos crecen uniforme y rápidamente. Igualmen-
te, cuando posteriormente se inocula en un medio de cultivo
15 un inoculum de los microorganismos que presentan la carac-
terística de crecimiento filamentosos, se produce un creci-
miento rápido en oposición con el lento crecimiento asocia-
do con los microorganismos que se encuentran en forma de
masas esféricas o cilíndricas compactas.

20 La glucosa isomerasa es producida fundamentalmente
en el interior de la célula por los microorganismos espe-
cíficamente identificados más arriba (Streptomyces wedno-
rensis ATCC 21175 y Streptomyces ATCC 21176). La glucosa
isomerasa puede ser separada de las células mediante un tra-
25 tamiento sónico en un medio acuoso y separando las células
por filtración. El filtrado que contiene glucosa isomerasa
puede ser utilizado para isomerizar glucosa en un jarabe
que la contenga. Sin embargo, en la práctica comercial, es
económicamente indeseable utilizar un procedimiento tan cog-
30 toso. En el método preferido del presente invento, las cé-

378525



ABR. 1970

1
5
10
15
20
25
30

lulas se separan del caldo fermentado y se utilizan directamente para isomerizar la glucosa. Junto con las células, también se separan materias extrañas. Como la actividad enzimática del caldo producido por el método del presente invento es desusadamente alta, por ejemplo del orden de 25 a 60 unidades de glucosa isomerasa por mililitro de caldo, son necesarias unas cantidades menores de las células para conseguir el grado deseado de isomerización que las que serían requeridas si la actividad enzimática del caldo fuera más baja. Por consiguiente, como las materias extrañas proporcionan cenizas y provocan la aparición de color en el jarabe isomerizado, es ventajoso producir células que posean una actividad de glucosa isomerasa extraordinariamente elevada.

Las cantidades de los materiales no nutritivos, acuosos dispersables, incorporados al medio de fermentación pueden variar entre amplios límites, por ejemplo, en el caso del agar, se prefiere entre 0,05 y 0,25 % aproximadamente y todavía mejor alrededor del 0,2 %. En el caso de la carboximetilcelulosa, por ejemplo el tipo comercializado por Hercules Powder Company bajo el nombre comercial CMC 7HP, las cantidades preferidas oscilan aproximadamente entre 0,1 y 2,0 % y todavía mejor son del orden de 0,5 %.

Con objeto de describir más claramente la naturaleza del presente invento, a continuación se incluyen algunos ejemplos específicos. No obstante, debe entenderse que esto se hace solamente a título de ejemplo y no se pretende delinear el alcance del invento ni limitar el ámbito de las reivindicaciones del apéndice. En los ejemplos y a lo largo de esta memoria, se utilizan los porcentajes para

378525



1 referirse al tanto por ciento en peso y están calculados
sobre el peso del medio nutritivo, o caldo, salvo indica-
ción en contrario.

5 En este caso, la determinación de la actividad de
glucosa isomerasa de la preparación enzimática se basa en
una modificación del método de la cisteína-carbazol de
Dische y Borenfreund que apareció en el Journal of Biolo-
gical Chemistry, Vol. 192 pág. 583 (1951). Este método se
pone en práctica de la siguiente forma:

10 Una porción del caldo de fermentación que contiene
glucosa isomerasa y prácticamente nada de material celular
se incuba a un pH de 7,5 y una temperatura de 70°C en un
medio acuoso que contiene los siguientes ingredientes:

15	Glucosa	0,1 M
	Na ₂ HPO ₄	0,05 M
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 M

20 Transcurrida 1 hora, se reduce el pH de la mezcla
de reacción hasta 3 aproximadamente con una solución al
5 % en peso de ácido perclórico, con objeto de inactivar
la glucosa isomerasa. Se introducen en un tubo de ensayo
1 ml de la mezcla de reacción, 0,2 ml de una solución al
0,2 % de hidrocloreuro de cisteína, 5 ml de una solución al
75 % en volumen de H₂SO₄ y 0,15 ml de carbazol al 0,12 %
25 en solución alcohólica, se mezcla y el tubo de ensayo se
introduce en un baño de agua mantenido a 60°C. Transcurri-
dos 10 minutos, se retira el tubo de ensayo del baño y se
enfria rápidamente a la temperatura ambiente. Se mide la
adsorción de la luz de la solución a 560 mμ y se determina
el contenido de fructosa de la muestra. Un miligramo de
30 fructosa equivale a una unidad de isomerasa. Se realizan



ABR. 1970

378525

1 unas pruebas en blanco apropiadas para compensar las ceto-
sas presentes en la preparación enzimática y las formadas
por isomerización alcalina.

EJEMPLO 1

5 Este ejemplo ilustra el efecto de la presencia de
una pequeña cantidad de un material no nutritivo, acuoso
dispersable, en una de las etapas de desarrollo del culti-
vo de Streptomyces wedmorensis ATCC 21175.

Desarrollo en tubo inclinado

10 Se prepara un medio de cultivo constituido por 0,4%
de xilosa, 0,4 % de extracto de levadura, 1 % de extracto
de malta, 2 % de agar y el resto de agua desionizada. El
pH se ajusta a 7,3 con NaOH. Este medio se esteriliza en
autoclave durante 20 minutos a 121°C y se dispone en forma
15 de tubos inclinados. Estos últimos se inoculan con Strep-
tomyces wedmorensis ATCC 21175 y se incuban durante 5 días
a 30°C. Se produce una esporulación uniforme del microor-
ganismo.

Etapas de desarrollo del cultivo

20 Etapas de desarrollo del cultivo
Etapas de desarrollo del cultivo
Etapa A. Se prepara un medio de cultivo acuoso, ajus-
tado a pH 7, conteniendo 1 % de xilosa, 1 % de peptona,
1 % de extracto de levadura, 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 %
de K_2HPO_4 y 0,1 % de agar. El medio, a excepción de la xi-
losa, se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a
25 121°C. La xilosa es esterilizada antes de su incorporación
al medio. Un matraz conteniendo 150 ml del medio se inocu-
la con esporas procedente de la etapa de desarrollo del
cultivo inclinado anterior, se mantiene el matraz a 30°C
y se agita durante 48 horas a 180 r.p.m., con objeto de
30 proporcionar unas condiciones de cultivo aerobias. Los mi-

378525



ABR 1970

1 celios obtenidos después de 48 horas son filamentosos y
están exentos del crecimiento del tipo esférico. Por el
contrario, cuando esta fermentación se realiza en ausencia
de agar, se produce un crecimiento de tipo esférico. Cuan-
5 do se utiliza el crecimiento de tipo esférico en las ferme-
taciones posteriores, solamente se producen pequeñas can-
tidades de glucosa isomerasa.

10 Etapa B. Se prepara un medio de cultivo acuoso,
ajustado a un pH de 7, conteniendo 3 % de salvado de tri-
go molido hasta atravesar un tamiz de 28 mallas según las
normas estadounidenses, 1 % de peptona, 1 % de extracto de
levadura, 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,024 % de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Es-
te medio se esteriliza en autoclave durante 90 minutos a
121°C. Un matraz de 2 litros conteniendo 800 ml del medio,
15 se inocula con 20 mililitros del desarrollo de cultivo

20 Etapa A. El matraz se mantiene a 30°C y se agita durante
48 horas a 180 r.p.m., con objeto de proporcionar condicio-
nes de cultivo aerobias. Los micelios obtenidos después
de 48 horas son filamentosos y están exentos de crecimiento
del tipo esférico.

Etapa de fermentación final (Etapa comercial)

25 Se prepara un medio acuoso ajustado a pH 7 que con-
tiene 4 % de licor de infusión de maíz (29° Bé), 4 % de
salvado de trigo molido hasta atravesar un tamiz de 28
mallas según las normas estadounidenses, 0,024 % de
30 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Este medio se esteriliza en autoclave durante
45 minutos a 121°C. El medio fermentado de la Etapa B se
inocula en un fermentador de acero inoxidable que contiene
25 litros de este medio. El fermentador está provisto de
propulsores para agitar el medio, una fuente de aire esté-

378525



9 ABR 1970

1 ril y un sistema de control de la temperatura. El fermentador se mantiene a una temperatura de 30°C y se introduce un volumen de aire estéril por cada volumen de medio y por minuto. El fermentador se mantiene bajo una presión manométrica de 10 psi (0,7 kg/cm²). Después de un tiempo de fermentación de 48 horas, se obtienen 43 unidades de glucosa isomerasa por mililitro de medio fermentado.

5 De lo anterior se deduce que la presencia de una pequeña cantidad de un material no nutritivo, acuoso dispersable, aumenta considerablemente el crecimiento de Streptomyces wedmorensis ATCC 21175 y el consiguiente rendimiento de glucosa isomerasa a partir del mismo.

EJEMPLO 2

15 Este ejemplo ilustra el efecto de la presencia de una pequeña cantidad de varios materiales no nutritivos, acuosos dispersables, en dos de las etapas de desarrollo del cultivo de Streptomyces wedmorensis ATCC 21175.

Etapas de desarrollo del cultivo

20 Etapas A. Se prepara un medio de cultivo acuoso, ajustado a pH 7 con NaOH, conteniendo 1 % de xilosa, 1 % de peptona, 1 % de extracto de levadura, 0,1 % de MgSO₄·7H₂O, 0,024 % de CoCl₂·6H₂O. El medio, a excepción de la xilosa, es esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 121°C. La xilosa es esterilizada antes de su incorporación al medio. Se inoculan 5 matraces de 2 litros, conteniendo cada uno de ellos 800 ml de este medio de cultivo, con 20 ml del desarrollo de cultivo Etapas A del Ejemplo 1. Se incorporan a los matraces diversas cantidades de materiales no nutritivos, acuosos dispersables. Después de la fermentación, bajo las condiciones descritas en el Ejem-

25

30

378525



ABR. 1970
ABR. 1970

1 plo 1, se determinan las actividades de glucosa isomerasa de las preparaciones y el tipo de crecimiento observado.

5 Etapa B. Unos inoculums procedentes de estas fermentaciones se incorporan a un medio como el descrito inmediatamente antes y se fermentan en las condiciones descritas en el Ejemplo 1. Se determina la actividad de las preparaciones y el tipo de crecimiento observado. Los resultados de este ejemplo se encuentran en la siguiente tabla.

10

TABLA I

Materiales no nutritivos, acuosos dispersables	Desarrollo del cultivo Etapa A		Desarrollo del cultivo Etapa B	
	Crecimiento	Actividad de glucosa isomerasa/ml	Crecimiento	Actividad de glucosa isomerasa/ml
agar al 0,2 %	Filamentoso	27	Filamentoso	29
15 HYFLO Super-Cel al 4% *	Filamentoso	20	Filamentoso	23
carboximetilcelulosa al 0,5 % **	Filamentoso	24	Filamentoso	22
20 almidón gelatinizado al 6 %	Filamentoso con algunas masas esféricas compactas	20	Filamentoso con algunas masas esféricas compactas	11
SOLKA Floc al 0,8% ***	Filamentoso con algunas masas esféricas compactas	18	Filamentoso con algunas masas esféricas compactas	17
25 Control (ninguno)	masas esféricas compactas	6	masas esféricas compactas	9

* Manufacturado por Johns-Manville (tierra de diatomeas)

** Manufacturado por Hercules Powder Co., (CMC 7HP)

*** Manufacturado por Brown Company (una celulosa de madera altamente purificada).

30

378525



APR. 1970

EJEMPLO 3

1 Este ejemplo ilustra el uso de glucosa isomerasa, producida a partir de los microorganismos cultivados de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores, para isomerizar la glucosa a fructosa en una solución que contiene glucosa.

5 A un medio de cultivo contenido en un fermentador a gran escala se incorporan unas cantidades adecuadas de inoculum procedente de una etapa de desarrollo de cultivo de uno de los ejemplos anteriores. La fermentación de los microorganismos se realiza en condiciones aerobias sumergidas, en ausencia de material no nutritivo, acuoso dispersable, como se describe en la Etapa de Fermentación Final del Ejemplo 1. El caldo se filtra a través de un filtro de tambor rotatorio a vacío, previamente recubierto con Dicalite CP-150 (Great Lakes Carbon Corp.). La torta del filtro contiene alrededor de 80 unidades de glucosa isomerasa por gramo.

10 A un jarabe que contiene glucosa (90 D.E. y 29° Bé) se añade $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en cantidad suficiente para obtener una concentración molar de 0,005 M y $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en cantidad suficiente para obtener una concentración molar de 0,001. El pH de esta solución que contiene glucosa se ajusta a 6,5 y se agrega torta del filtro que contiene la glucosa en cantidad suficiente para obtener un nivel de dosis de 15 unidades de glucosa isomerasa por gramo de glucosa. La solución se mantiene a una temperatura de 70°C y al pH antes indicado. Transcurridas 72 horas, se filtra el jarabe y se refina. El análisis del jarabe da alrededor del 38 % de fructosa y alrededor del 43 % de glucosa, estando

378525



1

basados los porcentajes sobre los sólidos presentes.

5

Los términos y expresiones que han sido empleados se han utilizado como términos de descripción y no de limitación y no se pretende en el uso de estos términos y expresiones excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o parte de las mismas, ya que se admite que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

10

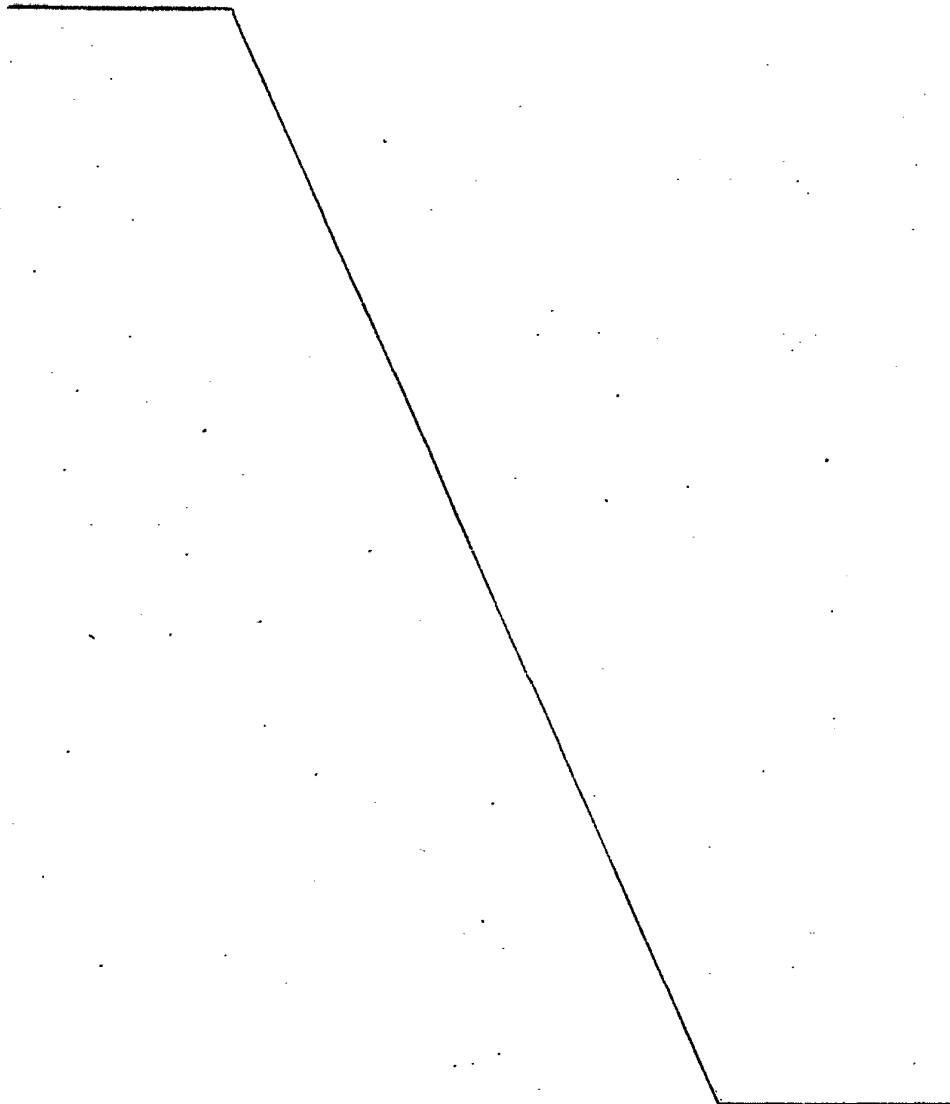
En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

15

20

25

30



378525



REIVINDICACIONES

1
5
10
1. Un procedimiento de desarrollo del cultivo de microorganismos del género Streptomyces que tienen la capacidad de asimilar el xilano para producir glucosa isomerasa, estando caracterizado dicho procedimiento por cultivar los microorganismos en etapas en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aerobias sumergidas, encontrándose presente por lo menos en una de las etapas de crecimiento iniciales una pequeña cantidad de un material no nutritivo, acuoso dispersable, que induce el crecimiento de los microorganismos en forma filamentosa.

15
2. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según la Reivindicación 1, caracterizado porque en la primera etapa de crecimiento se encuentra presente una pequeña cantidad de un material no nutritivo, acuoso dispersable.

20
3. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según las Reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por encontrarse presente en las dos primeras etapas de crecimiento una pequeña cantidad de un material no nutritivo, acuoso dispersable.

25
4. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los microorganismos son Streptomyces wedmorensis ATCC 21175 o Streptomyces ATCC 21176.

30
5. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el material no nutritivo es agar.

6. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según la Reivindicación 5, caracterizado porque la canti-

378525



1

dad de agar presente en el medio nutritivo está comprendida entre 0,05 % y 0,25 % en peso, aproximadamente, de preferencia alrededor del 0,2 % en peso, calculado sobre el peso del medio nutritivo.

5

7. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el material no nutritivo es carboximetilcelulosa.

10

8. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según la Reivindicación 7, caracterizado porque la cantidad de carboximetilcelulosa presente en el medio nutritivo está comprendida, aproximadamente entre 0,1 y 2,0 % en peso, calculado sobre el peso del medio nutritivo.

15

9. Un procedimiento de desarrollo de cultivo según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el material no nutritivo es tierra de diatomeas y la cantidad presente es alrededor del 4 % en peso, calculado sobre el peso del medio nutritivo.

20

10. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO DE DESARROLLO DEL CULTIVO DE MICROORGANISMOS DEL GENERO STREPTOMYCES QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE ASIMILAR EL XILANO PARA PRODUCIR GLUCOSA ISOMERASA".

25

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva, que consta de diecinueve páginas mecanografiadas.

30

Madrid, 13 Abril de 1.970

BERNARDO UNGRIA

P.P.