



378526

SECCION TECNICA
 CLASIFICACION
 CLAS. B12
 SUBCLAS. K

Nº 378.526
=====

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un a

PATENTE DE INVENCION.

SOLICITANTE: STANDARD BRANDS INCORPORATED

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

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA CULTIVAR MICRO-
ORGANISMOS DEL GENERO STREPTOMYCES QUE
PRODUCEH GIUCOSA ISOMERASA.

Prioridad: Patente n.º del
 MP.

**POOR
QUALITY**

378526



1 Este invento se refiere a un procedimiento mejora-
do para la producción de glucosa isomerasa. En particular,
el presente invento se refiere a un procedimiento mejorado
para la producción de glucosa isomerasa a partir de micro-
5 organismos clasificados como pertenecientes al género
Streptomyces.

Para los fines de este invento, el sistema utili-
zado para identificar el microorganismo del presente proce-
dimiento es el sistema de clasificación propuesto por el
10 Dr. S.A. Waksman en The Actinomycetes, Vol. 2, 1961,
Williams and Wilkins Company.

La aplicación principal de la glucosa y de los ja-
rabes de maíz que contienen glucosa se encuentra en la
transformación de alimentos, por ejemplo en las industrias
15 del horneado, bebidas, conservas y confitería, para propor-
cionar dulzura, cuerpo o para regular el crecimiento de los
cristales. Como la glucosa carece inherentemente de un al-
to grado de dulzura y tiene un sabor relativamente blando,
sus aplicaciones se encuentran algo limitadas. Esto ha si-
do superado, hasta cierto punto, mezclando la glucosa o el
20 jarabe de maíz con sacarosa o con jarabes invertidos para
aumentar la dulzura total. Pero esto no ha resultado ser
totalmente satisfactorio, debido a los factores económicos
y de otro tipo implicados. Se ha admitido que si durante la
producción de los jarabes de maíz y de otros jarabes que
25 contienen glucosa, pudiera convertirse en fructosa una pro-
porción importante del almidón, se obtendrían jarabes sufi-
cientemente dulces para satisfacer otros fines adicionales.

Es sabido que la glucosa puede ser convertida en
30 fructosa calentando una solución de glucosa en presencia de

6-6-73

- 3 -

378526



1 un catalizador alcalino. El producto isomerizado de este
proceso es generalmente muy coloreado y contiene sustan-
cias además de la fructosa y de la glucosa que son objeta-
bles y que comunican sabores secundarios indeseables. Se
5 han concedido patentes sobre procedimientos que están diri-
gidos a mejorar la isomerización alcalina de la glucosa,
por ejemplo las patentes estadounidenses 2.354.664 y
2.746.889 pero, que nosotros sepamos, ninguna ha sido pues-
ta en práctica comercialmente debido probablemente a su
10 elevado costo de operación y a la calidad relativamente ma-
la del producto.

Asimismo, diversas publicaciones describen procedi-
mientos enzimáticos para convertir la glucosa de los jara-
bes que la contienen en fructosa. Por ejemplo, en un artí-
culo aparecido en Science, Vol. 125, págs. 648-649 (1957)
15 se describe un procedimiento para convertir la glucosa en
fructosa mediante un enzima derivado de Pseudomonas hydro-
phila. Estos microorganismos requieren como fuente de hi-
dratos de carbono D-xilosa purificada. Otros microorganis-
mos bacterianos también requieren D-xilosa purificada como
20 fuente de hidratos de carbono para producir glucosa isomera-
sa.

La D-xilosa se obtiene por hidrólisis ácida o enzi-
mática de los xilanos. Los xilanos son los polisacáridos
25 más abundantes del grupo de la hemicelulosa. Aparecen prác-
ticamente en todas las plantas terrestres y en algunas algas
marinas. Presentan la máxima abundancia en los cultivos
anuales, especialmente en los residuos agrícolas como tusas
de maíz, tallos de maíz, cáscaras y tallos de gramíneas,
30 en los que se encuentran en cantidades que oscilan entre

378526



1 15 y 30 % en peso. Asimismo, las maderas duras contienen cantidades importantes de xilanos, por ejemplo en una proporción del 20 al 25 %.

5 En la hidrólisis ácida de los xilanos, se forman varios productos de reacción, por ejemplo furfural, hidroximetilfurfural y ácido levulínico, que son tóxicos para ciertos microorganismos e impiden la formación de glucosa isomerasa por los mismos. Para eliminar estos productos de reacción de los hidrolizados ácidos con objeto de obtener D-xilosa, que es una fuente adecuada de hidratos de carbono para los microorganismos bacterianos que producen glucosa isomerasa, se requieren unos procedimientos de refinación bastante largos y costosos, como los tratamientos con carbono y resinas cambiadoras de ión.

10

15 De acuerdo con el presente invento, se proporciona un procedimiento para cultivar microorganismos del género Streptomyces que producen glucosa isomerasa, cuyo procedimiento consiste en cultivar los microorganismos en etapas en un medio nutritivo acuoso en condiciones aerobias sumergidas, encontrándose presente por lo menos en la etapa de crecimiento final una fuente de hidratos de carbono derivada de un hidrolizado de un material que contenga xilano.

20

25 Para los fines del presente invento, el término "hidrolizado" significa un material que contiene xilano total o parcialmente hidrolizado. Cuando el xilano está totalmente hidrolizado, el hidrato de carbono principal presente es la D-xilosa. En el caso en que el xilano esté solo parcialmente hidrolizado, también se encuentran presentes oligosacáridos y polisacáridos además de la D-xilosa.

30 Los hidrolizados pueden ser producidos por técnicas



378526

1 bien conocidas. Por ejemplo, se pueden suspender en agua
unas cáscaras de semillas de algodón e incorporar a las
mismas unas cantidades de ácido sulfúrico o clorhídrico su-
ficientes para hidrolizar una porción sustancial del xila-
5 no dentro de un tiempo razonable. El tiempo requerido para
hidrolizar el xilano dependerá, naturalmente, de las tem-
peraturas, de las presiones y de la cantidad de ácido uti-
lizada. Por ejemplo, a una concentración de ácido sulfúri-
co de 0,1 a 0,5 M y a temperaturas y presiones relativa-
10 mente elevadas, el tiempo puede ser de 5 minutos solamente
mientras que a la presión atmosférica puede ser necesario
un tiempo de hasta 6 horas.

Como ejemplos de materiales que contienen xilano
hidrolizado que pueden ser utilizados en este procedimien-
15 to citaremos los hidrolizados ácidos de tucas de maíz, sal-
vado de trigo, cáscaras de semilla de algodón, paja, fibras
de madera y fibras groseras procedentes de un proceso de
molienda en mojado del maíz. También son adecuados los hi-
drolizados preparados por hidrólisis de pulpa de madera
20 a temperaturas y presiones elevadas. El hidrolizado prefe-
rido es un hidrolizado ácido de cáscaras de semilla de al-
godón.

La presencia de hidrolizados de materiales que con-
tienen xilano en el medio nutritivo para el crecimiento del
25 microorganismo del género Streptomyces estimula la produc-
ción de glucosa isomerasa. Por ejemplo, pueden obtenerse
mayores rendimientos o actividades más altas de glucosa
isomerasa en unos tiempos de fermentación más cortos cuando
los hidrolizados de materiales conteniendo xilano se encuen-
30 tran presentes en los medios de crecimiento que cuando se

378526



1 encuentra presente un material conteniendo xilano que no
ha sido hidrolizado.

5 Constituye una realización preferida del presente
invento el que los hidrolizados de los materiales que con-
tienen xilano utilizados en el medio nutritivo no hayan si-
do sujetos a procesos prolongados de refinación necesarios
para separar los diversos productos de reacción, como fur-
fural, hidroximetilfurfural y ácido levulínico, que son
normalmente tóxicos para ciertos microorganismos bacteria-
10 nos o impiden la formación de glucosa isomerasa por los
mismos. La realización más preferida del presente invento
consiste en que los hidrolizados de los materiales que con-
tienen xilano no hayan sido sometidos a los procesos de
refinación normales y que los hidrolizados hayan sido fil-
15 trados simplemente para separar los materiales insolubles
de los mismos antes de ser incorporados al medio nutritivo.
Los microorganismos del género Streptomyces que producen
glucosa isomerasa tienen la capacidad de crecer en un me-
dio nutritivo que contiene hidrolizados de xilano que no
20 han sido sometidos a refinación y producen glucosa isomera-
sa. Este descubrimiento proporciona el beneficio de que no
es necesario someter los materiales que contienen xilano a
costosos y prolongados procesos de refinación antes de su
uso en un medio nutritivo.

25 En los procedimientos comerciales para la propaga-
ción de microorganismos, es necesario proceder por etapas.
Estas etapas pueden ser pocas o muchas, según la naturaleza
del procedimiento y las características de los microorganismos.
Normalmente, la propagación se inicia inoculando las
30 esporas de un cultivo inclinado en un medio nutritivo pre-

378526



1 viamente esterilizado, contenido normalmente en un matraz
sacudidor. En el matraz se estimula el crecimiento de los
microorganismos por diversos medios, v.g. sacudiendo para
5 airear y manteniendo una temperatura adecuada. Esta fase o
etapa se repite una o más veces en matraces o vasijas que
contienen volúmenes iguales o mayores de medio nutritivo.
Estas etapas pueden ser denominadas convenientemente eta-
pas de desarrollo del cultivo. Los microorganismos proce-
dentes de la última etapa de desarrollo, con o sin el me-
10 dio de cultivo que los acompaña, se introducen o inoculan
en un fermentador a gran escala para producir cantidades
comerciales de los microorganismos o de sus subproductos.

Las razones para cultivar los microorganismos en
etapas son numerosas, pero dependen fundamentalmente de
15 las condiciones necesarias para el crecimiento de los mi-
croorganismos y/o de la producción de sus subproductos.
Estas son la estabilidad de los microorganismos, los agen-
tes nutritivos adecuados, pH, relaciones osmóticas, grado
de aireación, temperatura y mantenimiento de unas condi-
20 ciones de cultivo puras durante la fermentación. Por ejem-
plo, para obtener los máximos rendimientos de enzimas, pue-
de ser necesario cambiar algo las condiciones de fermenta-
ción de la etapa final con respecto a las practicadas para
obtener el crecimiento óptimo de los microorganismos en
25 las etapas de desarrollo del cultivo. También es una con-
sideración extraordinariamente importante el mantenimiento
de la pureza del medio, especialmente cuando la fermenta-
ción se realiza en condiciones aerobias. Si la fermentación
se comienza inicialmente en un fermentador grande, será ne-
30 cesario un periodo de tiempo relativamente largo para con-

378526¹³



1 seguir un rendimiento apreciable de microorganismos y/o de sus subproductos. Naturalmente, esto aumenta la posibilidad de contaminación del medio y de mutación de los microorganismos.

5 Un ejemplo de un microorganismo preferido utilizado en el procedimiento del presente invento es el Streptomyces sp. ATCC 21175. Las características taxonómicas de este microorganismo son las siguientes:

CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DEL STREPTOMYCES SP. ATCC 21175

10 A. Observaciones morfológicas Medio de cultivo

15	1. Esporoforos espirales de 3 a 6 vueltas; unos pocos esporoforos incompletos formando ganchos y lazos.	Agar extracto de levadura/extracto de malta; agar harina de avena; agar glicerol/asparragina; agar glicerol/almidón/glutamato; agar extracto de levadura/glucosa; agar tirosina; agar sintético glicerina; agar malato cálcico/glicerina; agar patata nutritiva; trozos de patata.
	2. 10 a 50 esporas en esporoforos	" " "
	3. Micelio no fragmentable	" " "
20	4. Superficie de las esporas retorcida cuando se observa en un microscopio electrónico con un aumento superior a 1000X; esporas redondas o ligeramente elípticas.	" " "

25 B. Color de la colonia

El color más representativo de las esporas y micelios aéreos "en masa" sobre la superficie de las colonias maduras es beige-marrón o marrón empañado, igual al color tab 3 ig en la rueda de colores de Fresner-Backus.

30 C. Lado inverso de la colonia

Ninguna pigmentación distintiva. Amarillo grisáceo o pardo sobre agar extracto de levadura/extracto de malta, agar harina de avena y agar almidón.

378526

13



1 D. Color en el medio

No se forma ningún pigmento.

E. Utilización de carbono

5 Se utilizan para el crecimiento L-arabinosa, D-fructosa, I-inositol, D-manitol, ramnosa y D-xilosa. No crece en sacarosa ni rafinosa.

F. Otras propiedades fisiológicas

10 El crecimiento es estrictamente aerobio, mesofílico. No hay crecimiento a 50°C sobre agar extracto de levadura/extracto de malta. Actividad proteolítica positiva sobre agar caseína de Gordon y Smith. Actividad diastática positiva sobre agar sales inorgánicas/almidón. Se producen compuestos volátiles con olor a tierra o moho durante el crecimiento activo del cultivo en la mayor parte de los medios.

15 Otro microorganismo adecuado del género Streptomyces es identificado como ATCC 21176. Los cultivos de estos organismos pueden ser obtenidos en la colección permanente de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852.

20 La glucosa isomerasa se produce fundamentalmente en el interior de las células por los microorganismos identificados específicamente más arriba (Streptomyces sp. ATCC 21175 y Streptomyces ATCC 21176). La glucosa isomerasa puede ser separada de las células mediante un tratamiento sónico en un medio acuoso y las células separadas por filtración. El filtrado que contiene glucosa isomerasa puede ser utilizado para isomerizar la glucosa en los jarabes de glucosa. Sin embargo, en la práctica comercial no es económicamente conveniente utilizar un procedimiento tan costoso. En el método preferido del presente invento, las células se separan del caldo fermentado y se utilizan directamente para isomerizar la glucosa. Junto con las células, se separan también materias extrañas. Como la actividad

25

30

378526



1 enzimática del caldo producido por el método del presente
invento es desusadamente alta, por ejemplo tan alta como
de 50 a 80 unidades de glucosa isomerasa por mililitro de
caldo, para conseguir el grado deseado de isomerización
5 son necesarias unas cantidades de células menores que las
que se requerirían si la actividad enzimática del caldo
fuera más baja. Por consiguiente, como las materias extra-
ñas forman cenizas y provocan el desarrollo de color en el
jarabe isomerizado, es ventajoso producir células que ten-
gan una actividad de glucosa isomerasa extraordinariamente
10 elevada.

 En el procedimiento preferido del presente inven-
to, se incorporan unas proporciones adecuadas de hidroliza-
dos ácidos de materiales que contienen xilano por lo menos
15 en una de las etapas de crecimiento finales. La cantidad
de hidrolizado agregada variará algo con las condiciones
en las que se realiza la fermentación. Típicamente, la can-
tidad de hidrolizado añadida será la requerida para obte-
ner una concentración de xilosa en el medio nutritivo com-
prendida entre 0,25 y 5 % aproximadamente. A niveles mayo-
res de hidrolizados no se obtienen nuevos beneficios. La
cantidad preferida de hidrolizado añadida es la necesaria
20 para obtener una concentración de xilosa del orden del 1 %.

 Durante la fermentación se ha observado que el cal-
do tiene tendencia a aumentar de acidez. Aunque el desarro-
llo de la acidez no es sustancialmente perjudicial duran-
te las etapas de crecimiento iniciales, ya que el creci-
miento de los microorganismos no es perjudicado considera-
blemente por ello, influye negativamente sobre el rendi-
miento de la glucosa isomerasa producida. Por lo tanto, de-
30

6-6-73

378526

13 A



1 be evitarse este desarrollo de acidez en la etapa de ferme-
tación final. Se obtienen rendimientos adecuados de gluco-
sa isomerasa cuando el pH del medio de fermentación está
comprendido entre 6,2 y 7,5 aproximadamente. Este valor
5 puede variar algo, dependiendo de las condiciones exactas
en las que se realiza la fermentación y de las cantidades
y tipos de reactivos utilizados. Por ejemplo, cuando se
utiliza como fuentes de nitrógeno una combinación de fosfa-
to de diamonio y de licor de infusión de maíz, el pH al
10 cual se obtienen los rendimientos máximos de glucosa isome-
rasa está comprendido entre 6,2 y 6,8 aproximadamente. Se
ha encontrado que pueden conseguirse los intervalos de pH
antes citados en el medio de fermentación introduciendo en
el mismo unas proporciones adecuadas de sorbitol y gluco-
15 sa. La presencia de sorbitol suele causar un aumento del
pH del medio durante la fermentación. Por otra parte, la
presencia de glucosa suele causar una disminución del pH
del medio durante la fermentación. Introduciendo en el me-
dio de fermentación de 0,4 a 1 % aproximadamente de glu-
20 cosa, preferentemente entre 0,6 y 0,8 % aproximadamente y
de 0,5 a 2,5 % de sorbitol, preferiblemente de 0,8 a 1,2 %
aproximadamente, el pH del medio durante la fermentación
se mantiene en el intervalo en el que se obtienen práctica-
mente unos rendimientos óptimos de glucosa isomerasa.

25 Otra realización preferida del presente invento
consiste en proporcionar por lo menos en una de las etapas
de crecimiento iniciales del microorganismo una pequeña
cantidad de un material no nutritivo, acuoso dispersable.

30 El término "no nutritivo, acuoso dispersable" en
el sentido utilizado aquí, define a un material que es fá-

378526

13



1

5

10

15

20

25

30

oilmente suspendible en un medio acuoso mediante una agitación suave (la agitación requerida normalmente para proporcionar las condiciones aerobias) o es suspendible coloidalmente en un medio acuoso y no es asimilado o no es completamente asimilado por el microorganismo durante el crecimiento del mismo. Son ejemplos de materiales dispersables adecuados el agar, la carboximetilcelulosa y la tierra de diatomeas. Unas cantidades pequeñas de estos materiales aumentan el crecimiento de los microorganismos y el rendimiento de glucosa isomerasa obtenida a partir de los mismos.

La presencia de los materiales no nutritivos, acuosos dispersables, durante el crecimiento de los microorganismos en condiciones de cultivo aerobias sumergidas produce micelios que son filamentosos. En algunos casos, según el tipo de material no nutritivo utilizado, pueden encontrarse presentes, junto a los micelios de forma filamentosa, una pequeña proporción de micelios en forma de masas esféricas compactas o gránulos cilíndricos. Cuando estos materiales no se encuentran presentes, los micelios producidos se encuentran en gran parte en forma de masas esféricas compactas o gránulos cilíndricos. El crecimiento de tipo filamentoso se prefiere porque los micelios están dispersados más uniformemente a través del medio nutritivo durante la fermentación y por lo tanto están más expuestos a los agentes nutritivos y al oxígeno. Por lo tanto, debido al tipo filamentoso de crecimiento, los microorganismos crecen uniforme y rápidamente. Asimismo, cuando posteriormente se inocula en un medio de cultivo un inoculum de los microorganismos que poseen la característica de



378526

1 crecimiento filamentosos, se produce un rápido crecimiento en contraposición con el lento crecimiento asociado a los microorganismos que se encuentran en forma de masas esféricas compactas o gránulos cilíndricos.

5 Son adecuadas unas pequeñas cantidades de estos materiales dispersables acuosos. Por ejemplo, en el caso del agar, se prefiere una proporción de 0,05 a 0,25 % aproximadamente, y todavía mejor alrededor de 0,1 %. En el caso de la carboximetilcelulosa, por ejemplo el tipo comercializado por Hercules Powder Company bajo el nombre comercial de CMC 7HP, las cantidades preferidas están comprendidas entre 0,1 y 2 % aproximadamente y todavía mejor alrededor de 0,5 %.

10 Con objeto de describir más claramente la naturaleza del presente invento, daremos a continuación 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 en toda esta memoria, se utilizan los porcentajes para referirse al tanto por ciento en peso y están calculados sobre el peso del medio nutritivo, o caldo, salvo indicación en contrario.

15 La determinación de la actividad de glucosa isomerasa de la preparación enzimática está basada en una modificación del método de cisteína-carbazol de Dische y Borenfreund, aparecido en Journal of Biological Chemistry, Vol. 192, pág. 583 (1951). Este método se realiza de la siguiente forma:

20
25
30

378526



1

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

5

Glucosa	0,1 M
NaH ₂ PO ₄	0,05 M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 M

10

Transcurrida 1 hora, se reduce el pH de la mezcla de reacción hasta 3 aproximadamente utilizando una solución al 5 % en peso de ácido perclórico con objeto de inactivar la glucosa isomerasa. En un tubo de ensayo, se introducen 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 una solución alcohólica al 0,12 % de carbazol, se mezcla y el tubo de ensayo se introduce en un baño de agua mantenido a 60°C. Transcurrido 10 minutos, se retira el tubo de ensayo del baño y se enfría rápidamente a la temperatura ambiente. Se mide la absorción de la luz de la solución a 560 mμ y se determina el contenido en fructosa de la muestra. Una unidad de glucosa isomerasa equivale a la formación de 1 miligramo de fructosa en las condiciones antes descritas. Se realizan unas pruebas en blanco apropiadas para compensar las cetosas presentes en la preparación enzimática y las formadas por isomerización alcalina.

15

20

25

30

El contenido en xilosa de los hidrolizados se determina por el método modificado de Lane-Eynon descrito en el Método E-26 de la Corn Industries Research Foundation, en los Métodos Analíticos Normalizados de las Compa-

378526 13 JUN 1960



1 ñias Miembros de la Corn Industries Research Foundation
y multiplicando por 0,85 el índice de reducción calculado
como dextrosa.

EJEMPLO 1

5 Este ejemplo ilustra el uso de tusa de maíz hidro-
lizada en medio ácido como única fuente de hidratos de car-
bono en la etapa de fermentación final de Streptomyces sp.
ATCC 21175 y el uso de un material no nutritivo, acuoso dis-
persable, en una etapa de desarrollo del cultivo.

10 La tusa de maíz hidrolizada al ácido se prepara
agregando 600 libras (272 kg) de tusas de maíz molidas a
unos 450 galones (1703 litros de agua) y agregando ácido
sulfúrico concentrado a la suspensión, con agitación, has-
ta que se obtiene una concentración de ácido 0,25 M. La
15 suspensión se calienta a 148°C bajo una presión manométrica
de 50 psi (3,5 kg/cm²) en unos 15 minutos, se mantiene
durante 10 minutos y se enfría a la temperatura ambiente
a lo largo de unas 2 horas. El pH del hidrolizado se ajusta
a 4 aproximadamente con una solución al 50 % de NaOH y se
20 filtra. El filtrado se concentra hasta 30° Baumé aproxi-
madamente.

Desarrollo del cultivo inclinado

25 Se prepara un medio de cultivo constituido por
0,4 % de xilosa purificada, 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 in-
troduce en tubos inclinados. Estos últimos se inoculan con
Streptomyces sp. ATCC 21175 y se incuban durante 5 días a
30°C. Se produce una esporulación uniforme de los micro-
30

378526.13



1 organismos.

Etapas de desarrollo del cultivo

5 Etapa A. Se prepara un medio de cultivo acuoso, ajustado a pH 7, que contiene 1 % de xilosa purificada, 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 xilosa, se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a $121^\circ C$. La xilosa se esteriliza antes de su incorporación al medio. Se inocula un matraz que contiene 10 30 ml del medio con esporas procedentes de la etapa de desarrollo del cultivo inclinado anterior, se mantiene el matraz a $30^\circ C$ y se agita durante 48 horas a 180 rpm con objeto de proporcionar unas condiciones de cultivo aerobias. Los micelios obtenidos son filamentosos y están exentos de 15 masas esféricas o cilíndricas compactas.

Etapa B. Se prepara un medio de cultivo acuoso, ajustado a pH 7, conteniendo 3 % de salvado de trigo molido hasta atravesar un tamiz de 28 mallas según las normas estadounidenses, 1 % de peptona, 1 % de extracto de levadura, 20 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,024 % de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Este medio se esteriliza en autoclave durante 90 minutos a $121^\circ C$. Un matraz de 2 litros que contiene 800 ml del medio se inocula con 20 ml del desarrollo de cultivo Etapa A. El matraz se mantiene a $30^\circ C$ y se agita durante 48 horas a 180 rpm con 25 objeto de proporcionar unas condiciones de cultivo aerobias. Los micelios obtenidos son filamentosos y están exentos de masas esféricas o cilíndricas compactas.

Etapa de fermentación final

30 Se preparan 25 litros de un medio acuoso, ajustado a pH 7, conteniendo 4 % de licor de infusión de maíz



378526 13

1 (29° Bé), 0,024 % de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y tusa de maíz hidrolizada
al ácido y filtrada en cantidad suficiente para obtener una
concentración de xilosa del 1 %. Este medio se esteriliza
en un fermentador de acero inoxidable tratándolo en auto-
clave durante 60 minutos. En este medio se inocula el medio
5 fermentado de la Etapa B. El fermentador está provisto de
unos propulsores para agitar el medio, una fuente de aire
estéril y un sistema de control de la temperatura. El fer-
mentador se mantiene a una temperatura de 30°C, bajo una
10 presión manométrica de 10 psi (0,7 kg/cm²) y se introduce
un volumen de aire estéril por volumen de medio y por minu-
to. Después de un tiempo de fermentación de 40 horas, se
obtienen 40 unidades de glucosa isomerasa por mililitro.
El pH final del medio es 7,5.

15 EJEMPLO 2

Este ejemplo ilustra el uso de sorbitol, glucosa
y tusas de maíz hidrolizadas al ácido como fuentes de hi-
dratos de carbono en la etapa de fermentación final del
Streptomyces sp. ATCC 21175.

20 Se prepara un inoculum en la forma descrita en el
ejemplo anterior y se incorpora a 25 litros de medio acuo-
so esterilizado, ajustado a pH 7, conteniendo 4 % de licor
de infusión de maíz (29° Bé), 0,024 % de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 %
de sorbitol, 0,80 % de glucosa y tusas de maíz hidrolizadas
25 al ácido (preparadas por el procedimiento descrito en el
Ejemplo anterior) en cantidad suficiente para obtener una
concentración de xilosa del 1 %. La fermentación se realiza
en la forma descrita en el ejemplo anterior. Después de un
tiempo de fermentación de 40 horas, se obtienen 73 unidades
de glucosa isomerasa por mililitro. El pH final del medio
30



378526

1 es 7,8.

De todo lo que antecede, se deduce que el sorbitol y la glucosa en combinación con las tusas de maíz hidrolizadas al ácido como fuentes de hidrato de carbono aumentan el rendimiento de glucosa isomerasa.

EJEMPLO 3

10 Este ejemplo ilustra el uso de sorbitol, glucosa y cáscaras de semilla de algodón hidrolizadas al ácido como fuentes de hidratos de carbono en la etapa de fermentación final del Streptomyces sp. ATCC 21175 y el uso de la glucosa isomerasa derivada de este microorganismo para convertir en fructosa la glucosa de un jarabe de glucosa.

15 El hidrolizado ácido de cáscaras de semillas de algodón se prepara en la forma descrita en el Ejemplo 1 para la preparación de tusas de maíz hidrolizadas.

20 Se prepara un inoculum de acuerdo con el Ejemplo 1 y se incorpora a 120 litros de un medio acuoso esterilizado, ajustado a pH 7, conteniendo 4 % de licor de infusión de maíz (29° Bé), 0,024 % de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 % de sorbitol, 0,76 % de glucosa y cáscaras de semilla de algodón hidrolizadas al ácido en cantidad suficiente para obtener una concentración de xilosa del 1 %. La fermentación se realiza en la forma descrita en el Ejemplo 1. Después de un tiempo de fermentación de 26 horas, este caldo se incorpora a 25 4000 litros de un medio acuoso, ajustado a pH 7, conteniendo 2,67 % de licor de infusión de maíz (29° Bé), 0,5 % de fosfato diamónico, 0,024 % de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 % de sorbitol, 0,5 % de glucosa y cáscaras de semilla de algodón hidrolizadas al ácido en cantidad suficiente para obtener una concentración de xilosa del 1 %. La fermentación se realiza 30



1 según el Ejemplo 1 y después de 26 horas tiene una activi-
dad de glucosa isomerasa de 76 unidades por mililitro. Se
añade alrededor del 4 % de Dicalite CP-150 (manufacturado
por Great Lakes Carbon Corp.) y las células se separan del
5 caldo fermentado por filtración a través de un filtro de
tambor giratorio a vacío, previamente cubierto con Dicali-
te CP-150. La torta del filtro húmeda contiene alrededor de
500 unidades de glucosa isomerasa por gramo.

10 A un jarabe de glucosa (89 D.E. y 30° Bé) se añade
de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en cantidad suficiente para obtener una con-
centración molar de 0,005 M y $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en cantidad sufi-
ciente para obtener una concentración molar de 0,001 M. El
pH de esta solución de glucosa se ajusta a 6,5 y se añade
la torta del filtro que contiene la actividad de glucosa
15 isomerasa en cantidad suficiente para obtener un nivel de
dosis de 15 unidades de glucosa isomerasa por gramo de glu-
cosa. La solución se mantiene a una temperatura de 67°C y
al pH indicado más arriba. Transcurridas 82 horas, se fil-
tra el jarabe y se refina. El análisis del jarabe da 38,5 %
20 de fructosa y 42,5 % de glucosa, estando basados los porcen-
tajes en los sólidos presentes.

EJEMPLO 4

25 Este ejemplo ilustra el uso de tusas de maíz mo-
lidas no hidrolizadas como única fuente de hidratos de car-
bono en la etapa de fermentación final de Streptomyces sp.
ATCC 21175.

30 Un inoculum preparado de acuerdo con el Ejemplo 1
(Etapa B) se incorpora a 100 ml de un medio acuoso esterili-
zado, ajustado a pH 7, conteniendo 8,0 % de tusas de maíz
molidas no hidrolizadas, 4 % de licor de infusión de maíz

378526

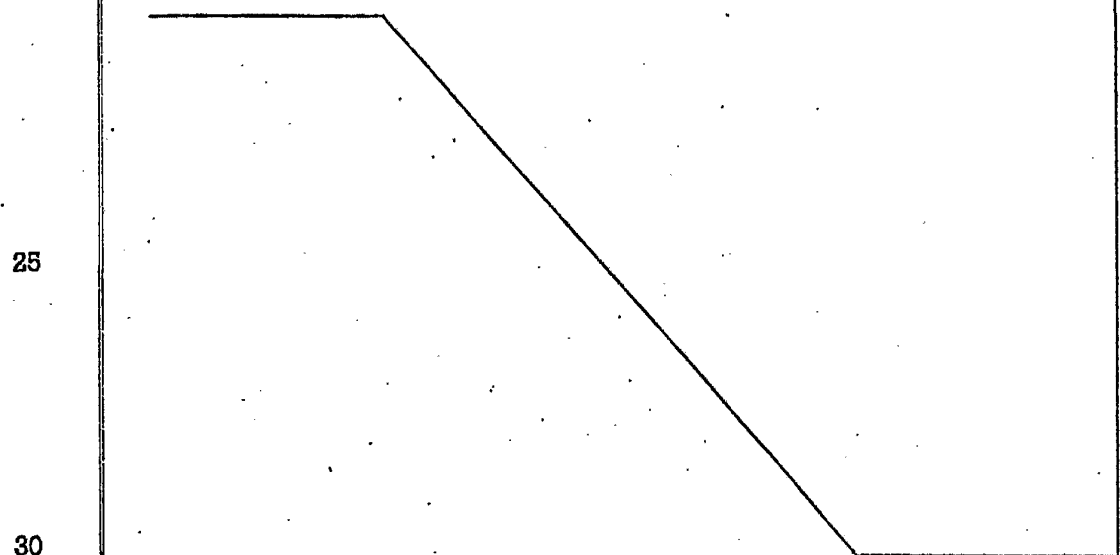


1 (29° Bé), 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,024 % de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. La
fermentación se realiza en un matraz mantenido a 30°C y
agitado durante 44 horas a 200 rpm, con objeto de propor-
cionar unas condiciones de cultivo aerobias. La actividad
5 de glucosa isomerasa es de 24 unidades por mililitro.

De este ejemplo se deduce que cuando se utilizan
tusas de maíz molidas no hidrolizadas como fuente de hi-
dratos de carbono en la fermentación de un microorganismo
del género Streptomyces, se obtiene un rendimiento de glu-
cosa isomerasa considerablemente menor que cuando se utili-
zan tusas de maíz hidrolizadas al ácido.
10

Los términos y expresiones que han sido empleados
se utilizan 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 mostra-
das y descritas o de sus partes, ya que se admite que son
posibles varias modificaciones dentro del alcance del inven-
to reivindicado.
15

En resumen, la Patente de Invención que se soli-
cita deberá recaer sobre las siguientes:
20



378526



REIVINDICACIONES

1

1. Un procedimiento para cultivar microorganismos del género Streptomyces que producen glucosa isomerasa, cuyo procedimiento está caracterizado por cultivar los microorganismos en etapas en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aerobias sumergidas, encontrándose presente por lo menos en la etapa de crecimiento final una fuente de hidratos de carbono derivada de un hidrolizado de un material que contiene xilano.

5

10

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado porque el hidrolizado es un hidrolizado ácido de un material que contiene xilano.

15

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque los microorganismos tienen la capacidad de asimilar el xilano.

20

4. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el hidrolizado no ha sido sometido a procedimientos de refinación externos para eliminar prácticamente el furfural, el hidroximetilfurfural y el ácido levulínico del mismo.

25

5. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el hidrolizado es un hidrolizado filtrado y no refinado.

30

6. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el hidrolizado está seleccionado entre el grupo formado por cáscaras de semilla de algodón, tucas de maíz, salvado de trigo y fibras groseras procedentes de los procesos de molienda en mojado del maíz, hidrolizados al ácido.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 5,

378526



1

caracterizado por encontrarse presente una cantidad de hidrolizado no refinado de un material que contiene xilano para estimular la producción de glucosa isomerasa sobre la obtenida cuando se encuentra presente la misma cantidad de material que contiene xilano que no ha sido hidrolizado.

5

10

8. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por encontrarse 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

9. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por encontrarse presente en el medio nutritivo acuoso una cantidad de material conteniendo xilano hidrolizado al ácido suficiente para obtener una concentración de xilosa comprendida entre 0,25 y 5 % en peso aproximadamente.

20

10. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque los microorganismos son Streptomyces sp. ATCC 21175 o Streptomyces ATCC 21176.

25

11. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el material no nutritivo es agar y se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,05 y 0,25 % en peso aproximadamente.

30

12. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por encontrarse adicionalmente presentes, por lo menos en la etapa de crecimiento

378526



1

final, unas cantidades de glucosa y sorbitol suficientes para mantener el pH del medio nutritivo dentro del intervalo que proporciona unos rendimientos prácticamente óptimos de glucosa isomerasa.

5

13. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por encontrarse presente, por lo menos en la etapa de crecimiento final de los microorganismos, de 1,4 a 1 % aproximadamente, y preferiblemente de 0,6 a 0,8 % aproximadamente, de glucosa y de 0,5 a 2,5 % aproximadamente, y preferiblemente de 0,8 a 1,2 % aproximadamente, de sorbitol, siendo la proporción de glucosa y sorbitol tal que mantiene el medio nutritivo durante la fermentación a un pH comprendido entre 6,2 y 7,5 aproximadamente y de preferencia entre 6,2 y 6,8 aproximadamente.

10

15

14. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA CULTIVAR MICROORGANISMOS DEL GENERO STREPTOMYCES QUE PRODUCEN GLUCOSA ISOMERASA".

20

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

25

30

Madrid, 13 Abril 1970

BERNARDO UNGRIA