

406665



P.- 52.009

Nº 87793 U.S. Serial  
Nº 181.639  
Case D 70046

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: C07G

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CPC INTERNATIONAL INC.

entidad norteamericana

establecida en International Plaza, Englewood Cliffs.

Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA ISOMERIZACION DE DEXTROSA

A LEVULOSA"

(Clase Internacional C07g)

406665

-3



Esta invención se refiere en general a isomerización enzimática. Más particularmente, la invención se refiere a mejoras en la producción de preparaciones de enzimas que son útiles para la isomerización de dextrosa a levulosa, y a su uso para tales isomerizaciones. La invención se refiere también a nuevas preparaciones de enzima isomerasa.

La producción de jarabe de maíz y de sólidos de jarabe de maíz, mediante la hidrólisis de almidón, ha progresado en la dirección de obtener siempre productos más dulces. Los hidrolizados ácidos que fueron los productos comerciales iniciales, han ido dando paso gradualmente a productos superiores en general, producidos mediante el uso de enzimas sacarificantes. La técnica ha avanzado hasta el punto de que pueden producirse rutinariamente hidrolizados enzimáticos a escala comercial a valores de E.D. superiores al 95%. Sin embargo, la industria está interesada en dulzores aún mayores y, se han llevado a cabo durante años investigaciones para técnicas de isomerizar hidrolizados de almidón y aumentar el contenido de levulosa.

La isomerización alcalina está limitada en el grado a que la isomerización puede llevarse a cabo eficazmente y con formación de productos comercialmente aceptables. Por consiguiente, ha habido durante mu-

2.11.72

406665



chos años investigaciones extensas para obtener una enzima que pudiera efectuar la isomerización. Estas investigaciones culminaron con el descubrimiento de que la isomerasa de xilosa, que cataliza la interconversión de D-xilosa y D-xilulosa, convertía D-glucosa (dextrosa) en D-fructosa (levulosa).

El uso de un microorganismo del orden de los Actinomycetales, para la producción de una enzima de isomerización, fue descrito por Sato y Tsumura en su trabajo "Estudio sobre la isomerización de dextrosa por una cepa de Streptomyces" en la Convención Anual de la Sociedad de Química Agrícola de Japón celebrada en Sapporo en Julio de 1964. Gran cantidad de trabajo posterior relativo al uso de microorganismos del género Streptomyces para la producción de enzima isomerasa ha sido llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones de Fermentación de Japón, según ha sido descrito por el Dr. Y. Takasaki y sus asociados. Algo de estos trabajos ha sido resumido en la publicación, Fermentation Advances, Academic Press, Nueva York, 1969, en el artículo del Dr. Takasaki y colaboradores que comienza en la página 561.

El trabajo de Sato y Tsumura llevó al uso de microorganismos Streptomyces para la producción de enzimas isomerasas mediante el empleo de un medio nutritivo que contiene xilosa. Desgraciadamente, si se

2.11.72

406665

-3



necesita xilosa para la producción de enzimas, hay limitaciones en la naturaleza y costo del medio que se requiere. El Dr. Takasaki y sus asociados identificaron ciertas cepas de Streptomyces que segregaban xilanas, y que, por consiguiente, podrían ser cultivadas en medios nutritivos que contenían xilano, que es mucho menos costoso que la xilosa. Desafortunadamente, los aspectos económicos y otras limitaciones sobre la naturaleza y costo del medio de cultivo requerido incluso para estos microorganismos, imponen limitaciones graves al proceso. Además, todas las cepas conocidas se ha considerado que requieren la presencia de cobalto en el medio de cultivo para la producción práctica de enzimas, y ésto crea un problema de evacuación.

Un propósito de la presente invención es proporcionar técnicas prácticas nuevas y mejoradas para la producción de preparaciones de enzimas de isomerización que no requieren el uso de xilosa para inducir la producción de la enzima y a la vez proporcionar técnicas prácticas para la producción de enzima de isomerización que no requieren el uso de cobalto en el medio de cultivo.

Un propósito más general de la presente invención es proporcionar procedimientos prácticos para la producción de una enzima de isomerización para con

2.11.72

406665



vertir hidrolizados de almidón o soluciones de dextro  
sa en productos que contienen levulosa, que son más  
interesantes para la explotación comercial que los pro  
cedimientos de la técnica anterior y proporcionar un  
5 procedimiento práctico mejorado para la obtención de  
productos que contienen levulosa.

Debido a la gran cantidad de expresiones que  
son de uso común en la técnica, se hacen algunas defi  
niciones para simplificar la presente solicitud y per  
10 mitir que sea más concisa.

E.D. La expresión "E.D" es una abreviatura  
de "equivalente de dextrosa", y estas expresiones se  
usan alternativamente refiriéndose al contenido de azú  
cares reductores de un material, calculado como dex  
15 trosa y expresado como tanto por ciento de sólidos to  
tales.

Hidrolizado de almidón. La expresión "hidro  
lizado de almidón" se usa de modo general refiriéndose  
a un jarabe o un producto seco que se prepara mediante  
20 hidrólisis del almidón. Tal producto puede prepararse  
mediante hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática, o  
mediante una combinación de hidrólisis ácida e hidró  
lisis enzimática. Un tipo preferido de hidrolizado de  
almidón para emplear para isomerización según la pre  
25 sente invención, se produce mediante hidrólisis, áci-

2.11.72

406665

-3



da o enzimática, hasta un E.D. de 10 o menos, seguida de sacarificación enzimática hasta un E.D. superior a 95, y preferiblemente superior a 97,5.

5           Glucosa y dextrosa. Los hidrolizados de almidón de E.D. medio, reciben habitualmente en la técnica el nombre de "glucosa", tanto si el hidrolizado de almidón se encuentra en forma de jarabe como si se encuentra en forma de sólidos. El término "dextrosa" se reserva comunmente para el monosacárido cristalino  
10 refinado que se recupera de un hidrolizado de almidón de elevado E.D., o para D-glucosa como constituyente de hidrolizados de almidón. Como se utiliza más adelante, el término "dextrosa" se utilizará para incluir este monosacárido en cualquier forma, en solución o se  
15 co, como constituyente de un jarabe de hidrolizado de almidón, sólidos del jarabe, o en forma cristalina refinada.

Fructosa y levulosa. Los términos "fructosa" y "levulosa" se emplean en general alternativamente  
20 en la técnica refiriéndose al isómero de dextrosa que es más dulce que la dextrosa. Este isómero se encuentra en la miel y en el azúcar invertida junto con la dextrosa, y es valioso debido a su dulzor. El término "levulosa" se utilizará para referirse a este monosacárido.  
25 rido.

406665



La enzima. La enzima que isomeriza la dextrosa a levulosa ha sido denominada en la técnica con diversos nombres. En la patente de Marshall 2.950.228 se la denomina isomerasa de xilosa debido a que isomeriza xilosa a xilulosa. Esta actividad está en adición a su capacidad de isomerizar dextrosa a levulosa. También ha sido denominada en la técnica isomerasa de dextrosa e isomerasa de glucosa. La expresión "isomerasa de xilosa" se utilizará en esta Memoria por razones que se describen en seguida, bajo el título "Caracterización de la enzima".

Preparación de enzima. La expresión "preparación de enzima" se emplea refiriéndose a cualquier composición de materia que exhibe la actividad enzimática de isomerasa de xilosa. La expresión se utiliza refiriéndose, por ejemplo, a células totales vivas, células secas, extractos de células y preparaciones refinadas y concentradas que proceden de las células. Las preparaciones de enzima pueden ser en forma seca o en forma líquida.

Unidades. En esta solicitud, todas las partes y todos los tantos por ciento son en peso, a menos que expresamente se indique de otra manera.

Unidad de isomerasa. Una unidad de isomerasa se define como la cantidad de enzima que se necesita

2.11.72

406665



para producir un micromol de levulosa por minuto bajo las condiciones de isomerización descritas más adelante bajo el título "Valoración de la actividad de isomerasa".

5                    Streptomyces. Este término se refiere a un género de microorganismos del orden de Actinomycetales. Estos microorganismos son actinomicetos que producen micelios aéreos. El género es bien conocido. Algunas de sus características diferenciativas importantes se describen, por ejemplo, en el texto, "The Actinomycetes", de Selman A. Wakamann, The Ronald Press Company, Nueva York, 1967, página 135 y siguientes.

10                    Se ha descubierto en la actualidad que es posible producir preparaciones de enzima isomerasa de xilosa en una base práctica, cultivando en un medio nutritivo un microorganismo del género Streptomyces que se caracteriza por su capacidad para formar una cantidad apreciable de isomerasa de xilosa cuando se cultiva en un medio nutritivo exento de xilosa y de materiales que suministran xilosa, y esencialmente exento de cobalto.

15                    Los microorganismos preferidos son cepas mutantes de Streptomyces olivochromogenes, en especial S. olivochromogenes ATCC Nos. 21.713, 21.714, 21.715 y sus equivalentes. Estos microorganismos tienen los

2.11.72



requisitos funcionales característicos , es decir, forman cantidades apreciables de isomerasa de xilosa cuando se cultivan en un medio nutritivo que está exento de xilosa y de materiales que suministran xilosa y que están exentos de cobalto añadido. Si bien se prefieren estos microorganismos específicos, se opina que cualquier microorganismo del género Streptomyces puede ser mutado para asegurar una cepa que tenga las características deseadas.

10                   Aun cuando es posible, según la invención, producir preparaciones de enzima adecuadas a escala práctica mediante cultivo del microorganismo seleccionado en un medio nutritivo que esté exento de xilosa y de materiales que suministran xilosa y que también  
15                   esté esencialmente exento de cobalto, se obtienen resultados en general aún mejores y más económicos cuando se encuentran presentes en el medio nutritivo en el que han de cultivarse los microorganismos preferidos, xilosa, cobalto o ambos.

20                   Producción de Cepas Mutantes

Se seleccionó una cepa madre, S. olivochromogenes ATCC 21.114, para la mutación debido a que se sabía que era una fuente buena de isomerasa de xilosa.

25                   Este microorganismo se expuso en estado de espora, a una dosis de luz ultravioleta suficiente pa

406665



ra matar el 97% de los microorganismos expuestos. Los esporos irradiados se cultivaron en placas y se ensayó cada colonia para comprobar su actividad enzimática. Dado que el medio sobre el que se cultivaron las

5 colonias no contenía xilosa para inducir la formación de enzima isomerasa, sólo aquella colonia que tenía las características deseadas mostraba una reacción enzimática positiva. Esta columna fue aislada y se ensayó extensamente, para demostrar que la nueva cepa mutante producía sin lugar a dudas, cantidades apreciables de isomerasa de xilosa sin necesidad de que hubiese xilosa en el medio nutritivo como agente de inducción.

En mayor detalle, las etapas incluidas en este procedimiento fueron las siguientes. Se cultivó S. olivochromogenes ATCC 21.114 sobre ágar almidón de Difco, llevado a 2,0% de ágar añadiendo ágar, hasta que el cultivo hubo esporulado abundantemente. Estos esporos fueron recogidos entonces y suspendidos en 20 ml de una solución al 0,1% del tensoactivo Tween 80 (marca registrada de Atlas Powder Co. para un derivado polioxialcoholénico de monooleato de sorbitán). Después se añadió 0,1% de un agente dispersante, Marasperse C (la marca registrada de un agente dispersante de la firma Marathon Papel Mills Co. para un agente

406665

-3



dispersante de ácido lignín-sulfónico), y la suspensión fue sometida a ultrasonidos durante dos impulsiones de 15 segundos cada una, para romper las cadenas y agrupaciones de los esporos. La suspensión de esporos resultante fue examinada y se encontró que estaba relativamente libre de cadenas de esporos.

Esta suspensión de esporos se expuso en una placa de poca profundidad, con agitación, a luz ultravioleta procedente de una Sterilamp Westinghouse (782H-10) a una distancia de diez centímetros durante unos ocho minutos. Esta exposición produjo la muerte del 97% de los esporos. La suspensión se diluyó después y a la dilución apropiada proporcionando unas 100 colonias por placa, fue sembrada en placas de Petri que contenían el medio siguiente:

Tabla 1

Medio de Agar

	Sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.	1,0%
	Extracto de levadura Difco	0,05%
20	Bactopeptona Difco	0,05%
	Bactotriptonna Difco	0,05%
	Agar	1,5%

pH llevado a 7,5 con NaOH

Crecieron unas 40 a 80 colonias por placa y se aislaron subsiguientemente. Estas porciones aisla-

2.11.72



das fueron seleccionadas por su capacidad de isomerizar xilosa después de ser cultivadas en un medio que no contenía xilosa o material alguno que suministrara xilosa.

5

Aislamiento del Mutante y fermentación con el mismo

Se encontró una porción aislada que producía actividad de isomerasa al cultivarla en ausencia de xilosa. La actividad de isomerasa producía unas 0,155 unidades/ml. Después de un segundo pase, la actividad aumentó a 0,6 unidades/ml.

10

El cultivo se sometió después a varios pases más y entonces se cultivó en placas para volver a aislarle. Se seleccionaron once colonias, se cultivaron sobre medios inclinados y después fueron cultivadas mediante dos etapas de siembra. Las once segundas etapas de siembra fueron utilizadas para inocular dos medios de cultivo, identificados más adelante como Medio A y Medio B respectivamente. Además, con propósitos comparativos, se utilizó también una siembra cultivada del cultivo madre S. olivochromogenes ATCC 21.114, para inocular los mismos dos medios de cultivo

15

20

El procedimiento empleado y las observaciones hechas se describen en detalle a continuación.

25

Para las dos etapas de siempre el medio em-

406665



pleado tenía la composición indicada en la Tabla 2.

Tabla 2

Primero y segundo medio de siembra

	Sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.	1,0%
5	Líquido de macerado de maiz (55% de sólidos)	3,6%
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05%
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,024%

El pH se llevó a 7,0 con NaOH, con 1 gota de agente antiespumante por matraz.

10 La siembra de la primera etapa se llevó a cabo durante dos días con 100 ml de medio de siembra en cada uno de los matraces Erlenmeyer de 500 ml requeridos, utilizando un agitador de vaivén a 28°C. Los esporos procedentes de cada uno de los medios inclinados respectivos fueron utilizados para inocular cada uno de estos matraces.

15

La segunda etapa de siembra se llevó a cabo durante un día, con 200 ml del medio de siembra en cada uno de los matraces Hinton de 1 litro necesarios, utilizando un agitador rotatorio Gump, a 28°C. Se utilizaron porciones de diez ml de la primera siembra para inocular cada uno de los matraces de la segunda siembra, respectivamente.

20

Porciones de cinco ml de material procedente de las segundas etapas de siembra, se utilizaron des

25

2.11.72

406665

pués para inocular medios de cultivo que tenían, respectivamente, las composiciones siguientes:



Tabla 3

Medios de cultivo A y B

5	<u>Medio A</u>	
	Sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.	2,0%
	Líquido de macerado de maiz (55% de sólidos)	3,6%
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,2%
10	Glicocola	0,3%
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05%
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,024%
	pH a 7,0 con NaOH	
	<u>Medio B</u>	
15	Xilosa	2,2%
	Sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.	1,2%
	Líquido de macerado de maiz (55% de sólidos)	3,6%
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,2%
20	Glicocola	0,3%
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,024%
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05%
	pH a 7,0 con NaOH	

Para la fermentación se colocaron 100 ml del medio de cultivo apropiado respectivo en cada uno de

2.11.72



los matraces Hinton de 1 litro necesarios. Se añadió a cada matraz una gota de agente antiespumante, se esterilizaron los matraces y después se enfriaron. Después de la inoculación, se colocaron los matraces en un agitador rotatorio Gump y se mantuvieron a 28°C durante dos días.

Recolección de la preparación de enzima

Después de fermentación, el contenido de cada matraz fue centrifugado a una gravedad de 10.000 veces durante 15 minutos. La masa celular se separó entonces, se pesó y se congeló para su almacenamiento. Para la titulación o para el empleo, la masa celular o una parte proporcionada, se reconstituyó a su volumen primitivo con agua destilada, y las células volvieron a suspenderse. Una vez reconstituida la suspensión celular fue valorada de la manera que se describe más adelante.

Conversión de la suspensión celular a forma solubilizada

Para preparar la enzima para la valoración, en primer lugar es necesario convertirla en forma soluble. Un medio adecuado para efectuar esto es mediante ultrasonidos.

Las células que proceden de un volumen conocido de caldo de cultivo se resuspenden en solución

406665



amortiguadora de fosfato 0,05 molar (pH 7,5). La suspensión se somete entonces a la acción de ultrasonidos utilizando el Sonificador Branson, Modelo 185-D( 20 kc ) hasta que las células microbianas de la muestra están

5 suficientemente rotas para liberar sustancialmente la totalidad de la enzima isomerasa. Manteniendo el tubo de la muestra en un baño de hielo durante el tratamiento con ultrasonidos se evita el sobrecalentamiento y la inactivación de la enzima.

10 La preparación de enzima que resulta era una solución de isomerasa de xilosa solubilizada.

Valoración de la actividad de isomerasa

El procedimiento de valoración lleva consigo el efectuar una determinación espectrofotométrica de la cetosa producida partiendo de una solución de glucosa, bajo un conjunto normalizado de condiciones.

15

Se preparó una solución de reserva de la manera siguiente:

Tabla 4

20 Solución de reserva para la valoración

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,1 M	1 ml
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O 0,01 M	1 ml
Solución amortiguadora de fosfato 1 M, pH 7,5	0,5 ml
25 D-glucosa anhidra	1,44 g
Agua destilada	Cantidad suficiente para completar un volumen total de 7,5 ml

2.11.72



La preparación de enzima a valorar se diluyó primeramente para que contuviera de 1 a 6 unidades de isomerasa por ml.

5 Se llevó a cabo una isomerización enzimática añadiendo 1 ml de la preparación de enzima a 3 ml de la solución de reserva e incubando durante 30 minutos a 60°C. Al término del periodo de incubación se tomó una parte alícuota de 1 ml y se enfrió en un volumen de 9 ml de ácido perclórico 0,5 N. La parte alícuota  
10 enfriada se diluyó después hasta un volumen total de 250 ml. Como testigo, con propósitos comparativos, se llevó a cabo también un blanco de glucosa sustituyendo el ml de preparación de enzima en forma de solución por 1 ml de agua, el comienzo del periodo de incubación.

15 Se determinó después la cetosa por el método de la cisteina-ácido sulfúrico; para los propósitos de esta valoración, una unidad de isomerasa se define como la cantidad de actividad de enzima que se necesita para producir un micromol de levulosa por minuto bajo  
20 las condiciones de isomerización descritas. Los resultados de la valoración están resumidos en la Tabla 5 que figura a continuación.

25

2.11.72

406665 -3



Tabla 5

## RESULTADOS DE LA VALORACION

Cultivo	Medio A (sin xilosa)		Medio B (xilosa)	
	Actividad de isomerasa $\mu$ /ml	Peso de células secas g/litro	Actividad de isomerasa. $\mu$ /ml	Peso de células secas g/litro
Cepa madre	0,24	6,45	7,46	8,75
Cepa madre	0,04	6,56	6,63	9,32
Mutante CPC 3	5,48	6,87	2,73	8,81
Mutante CPC 4	2,06	6,44	5,51	5,82
Mutante CPC 6	3,02	5,87	3,72	5,39
Mutante CPC 7	1,45	6,66	3,00	9,58
Mutante CPC 8	3,11	6,45	5,37	8,08
Mutante CPC 9	1,95	6,52	3,54	6,93
Mutante CPC 10	2,14	6,72	2,70	7,17
Mutante CPC 11	1,58	6,33	3,46	5,99
Mutante CPC 12	2,88	7,27	5,50	8,08
Mutante CPC 13	2,05	7,33	2,16	10,27
Mutante CPC 14	2,37	7,17	6,05	7,14

Las cepas mutantes CPC 3, CPC 4 y CPC 8 fueron seleccionadas para un mantenimiento continuado. Una semana después de asegurar los resultados anteriormente citados, cada uno de estos tres mutantes fue



utilizado otra vez para inocular los dos medios de cultivo respectivos, con los resultados que figuran a continuación.

Tabla 6

5

RESULTADOS DE LA SEGUNDA VALORACION

		<u>Medio A (sin xilosa)</u>		<u>Medio B (xilosa)</u>	
		<u>Actividad de isomerasa</u>	<u>Peso de celulas secas</u>	<u>Actividad de isomerasa</u>	<u>Peso de células secas</u>
10	<u>Cultivo</u>	<u>μ/ml.</u>	<u>g/litro</u>	<u>μ/ml</u>	<u>g/litro</u>
	Mutante CPC 3	4,80	5,39	11,42	7,53
	Mutante CPC 4	5,70	6,44	9,68	7,30
	Mutante CPC 8	2,97	6,10	4,43	6,39

15

Se consideró que estas observaciones establecían que los mutantes tenían la capacidad de producir isomerasa de xilosa sin necesidad de xilosa en el medio de cultivo. Además, se observó que algunos de los cultivos producían sustancialmente más enzima que la cepa madre, cuando se hacían crecer en un medio de cultivo que contenía xilosa. Esta característica es muy importante con propósitos comerciales, ya que la mayor productividad significa que se necesita menos capacidad del fermentador para producir una cantidad de enzima dada.

20

25

2.11.72

406665



Efecto de la fuente de hidrato de carbono en el medio de cultivo

Para demostrar el efecto de la fuente de hidrato de carbono en el medio de cultivo y demostrar asimismo la capacidad de la cepa mutante CPC 3 para producir enzima cuando se cultivaba en presencia de una diversidad de hidratos de carbono como única fuente de carbono, se cultivaron varias cepas seleccionadas de Streptomyces. El medio de cultivo fue idéntico en cada caso, excepto el hidrato de carbono presente. Las otras condiciones se mantuvieron constantes. Las observaciones están registradas a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7

Efecto del tipo de hidrato de carbono presente sobre la producción de isomerasa con cultivos de Streptomyces

Organismo	Glicerina	Manosa	Glucosa	Hidroli-	Hidroli-
	2%	2%	1,5%	zado de almidón de 15 E.D. 2%	zado de almidón de 15 E.D. 1% xilosa 2%
Actividad de isomerasa de glucosa, Unidades/m.					
<u>S. phaeochromogenes</u>	--	--	0,3	0,2	1,4
NRRL 82119					
<u>S. griseoruber</u>	--	--	0,3	0,2	4,5

406665

-3



	<u>S. purpeofuscus</u>	--	--	0,3	0,2	1,3
	IAM 0073					
	<u>S. olivochromogenes</u>	0,4	0,4	0,2	0,2	3,4
	ATCC 21.114					
5	<u>S. olivochromogenes</u>	1,3	1,9	2,2	2,3	6,3
	Mutante CPC 3					

Como demuestran estas observaciones, las cepas distintas de las cepas mutantes CPC 3 produjeron muy poco enzima cuando se cultivaron en todos los medios de cultivo empleados que no contenían xilosa. Sin embargo, el mutante produjo enzima en cantidades más abundantes en ausencia de xilosa, y cantidades aún mayores cuando se cultivaron en presencia de xilosa.

#### 15 Caracterización de los microorganismos

Para caracterizar con mayor detalle los microorganismos que se utilizan en la práctica de la presente invención, se presenta la información siguiente. Esta información está reunida de forma similar a la utilizada en la descripción del género Streptomyces de los Actinomycetales en el "Manual de Microbiología Determinativa" de Bergey, 7ª Edición.

La primera descripción se aplica a la cepa madre de la que fueron derivados los mutantes. Las otras descripciones se aplican a dos cepas de mutantes, las

2.11.72

406665

-3



CPC 3 y CPC 15, que se prefieren para usar en la práctica de la presente invención. La cepa CPC 15 es una sóla colonia aislada de la cepa CPC 3.

Streptomyces olivochromogenes ATCC 21.114 (Madre)

- 5 Micelio aéreo: Filamentos con espirales medias a cerradas. Conidios elipsoidales a esféricos.  
Hendidura en gelatina: Crecimiento bueno. Licuación dentro de 10 días.
- 10 Agar: Crecimiento de aspecto rugoso, de color tostado a gris. Pigmento soluble producido de color pardo o negro pardusco.
- Agar sintético: Micelio aéreo y superficial blanco. No produjo pigmento.
- 15 Agar almidón: Crecimiento abundante de color amarillo. Almidón hidrolizado.
- Agar glucosado: Crecimiento abundante, color tostado a gris o gris oscuro.
- Caldo glucosado: Crecimiento fino, pardo, sedimento escamoso.
- 20 Leche tornasolada: Anillo pardo oscuro; coagulación rápida.
- Trozos de patata: Crecimiento abundante de color blanco. Pigmento producido soluble de color pardo a negro.
- 25 Nitritos producidos partiendo de nitratos.

2.11.72

- 22 -

406665



Aerobio

Crece bien a 28-37°C.

Streptomyces olivochromogenes, Mutante CPC 3

5 Micelio aéreo: Filamentos con espirales medias a cerradas. Conidios elipsoidales a esféricos.

Hendidura en gelatina: Crecimiento malo en 30 dias; no hay licuación aparente.

10 Agar: Crecimiento de aspecto rugoso de color tostado a gris. Pigmento soluble producido de color pardo a negro pardusco.

Agar sintético: Micelio aéreo y superficial blanco. No se produjo pigmento.

Agar almidón: No hay crecimiento. No hay hidrólisis del almidón.

15 Agar glucosado: Crecimiento abundante de color tostado a gris o gris oscuro.

Caldo glucosado: Crecimiento fino, pardo, sedimento es camoso.

20 Leche tornasolada: Anillo pardo oscuro; coagulación a 37°C, coagulación mala a 28°C.

Trozos de patata: Crecimiento abundante, blanco, Pigmento soluble producido de color pardo a negro.

Nitritos producidos partiendo de nitratos.

25 Aerobio.

Crece bien a 28-37°C.

2.11.72

406665

-3



Streptomyces olivochromogenes, Mutante CPC 15

Micelio aéreo: Filamentos con espirales medias a cerradas. Conidios elipsoidales a esféricos.

Hendidura en gelatina: Crecimiento malo en 30 días,  
5 no hay licuación aparente.

Agar: Crecimiento de aspecto rugoso de color tostado a gris. Pigmento soluble producido de color pardo a negro pardusco.

Agar sintético: Micelio aéreo y superficial blanco. No  
10 se produjo pigmento.

Agar almidón: Crecimiento abundante. Almidón hidrolizado.

Agar glucosado: Crecimiento abundante de color tostado a gris o gris oscuro.

Caldo glucosado: Crecimiento fino, pardo; sedimento es  
15 camoso.

Leche tornasolada: Anillo pardo oscuro; coagulación a 37°C; coagulación mala a 28°C.

Trozos de patata: Crecimiento abundante; pigmento soluble producido de color negro.  
20

Nitritos producidos partiendo de nitratos.

Aerobio.

Crece bien a 28-37°C.

Las cepas mutantes siguientes han sido depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Ame)  
25

2.11.72

406665



riçan Type Culture Colection) y se mantienen allí con forme a un contrato entre dicha colección y el cesionario de esta solicitud de patente.

Tabla 8

5

Cepas depositadas

<u>Cepa Mutante Nº</u>	<u>Depósito de Cultivo Nº</u>
CPC 3	21.713
CPC 4	21.714
CPC 15	21.715

10

La Colección Americana de Cultivos Tipo tiene la dirección siguiente:

American Type Culture Collection  
12301 Parklawn Drive  
Rockville, Maryland 20852

15

El contrato de la Colección de Cultivos proporciona una disponibilidad permanente del cultivo al público, por promulgación de la patente. El cesionario de la presente solicitud ha convenido que si alguno de estos cultivos en depósito muriera o fuera destruido durante la duración efectiva de la patente, será reemplazado con un cultivo vivo de los mismos organismos.

20

Caracterización de la Enzima

Se efectuó una determinación de las constantes de Michelis (Km) por reacción sobre xilosa y sobre dextrosa.

25

2.11.72

406665

-3



El propósito fue revelar las afinidades relativas de la preparación de enzima para estos substratos. En la actualidad, todas las isomerasas que fueron examinadas que convierten directamente la dextrosa en levulosa son isomerasas de xilosa. La determinación se llevó a cabo utilizando un extracto sónico del cultivo.

Se encontró que se obtenía una Km más baja cuando la preparación de enzima actuaba sobre xilosa que cuando actuaba sobre dextrosa. Esto estableció la xilosa como substrato natural de la isomerasa y la enzima como una verdadera isomerasa de xilosa.

La capacidad de las isomerasas de xilosa de los mutantes de la presente invención para aceptar dextrosa como substrato, se cree debido a las semejanzas estructurales estrechas entre la xilosa y la dextrosa. Dado que los mutantes de la presente invención producen la enzima isomerasa o bien en presencia de xilosa o en ausencia de la misma, la enzima es constitutiva, más bien que necesariamente inducida, sólo mediante la presencia de xilosa en el medio de cultivo. Cuando el medio de cultivo contiene xilosa, la enzima puede ser tanto constitutiva como inducida.

Se presentan los ejemplos siguientes para describir adicionalmente la invención.

2.11.72

Ejemplo 4 406665



Producción de enzima por la cepa mutante CPC 3

5 Este ejemplo describe la producción de isome  
rasa según un modo preferido de poner en práctica la  
presente invención.

10 Se inocularon esporos procedentes de un cul  
tivo en un medio inclinado de cepa mutante CPC 3 a un  
matraz erlenmeyer de 500 ml que contenía 100ml de un  
medio estéril compuesto por los ingredientes descritos  
en la Tabla 9 que figura a continuación.

Tabla 9

Composición del medio inóculo\*

<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
Sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.	2,0
15 Líquido de macerado de maiz (55% de sólidos)	3,6
Sulfato magnésico ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,05
Agua destilada	Resto

20 \*El medio es una solución acuosa estando cal  
culados todos los pesos como tanto por ciento del medio  
total incluyendo el agua.

25 Se ajustó el pH del medio de cultivo a 7,1  
aproximadamente con hidróxido sódico y se esterilizó  
a 121°C durante 30 minutos. El matraz fue inoculado y  
después se incubó durante unas 60 horas a una tempera  
tura de unos 28°C en un agitador de vaivén a 120 ci-

406665



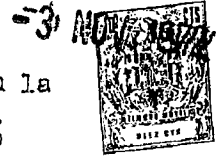
culos por minuto.

Para la segunda etapa de desarrollo se preparó una cantidad de unos 200 ml de medio inóculo estéril que tenía la composición descrita en la Tabla 9, en cada uno de varios matraces erlenmeyer modificados Hinton de 1000 ml. Se sacó entonces una porción de 10 ml del matraz erlenmeyer de 500 ml y se pasó a matraz erlenmeyer modificado Hinton. El matraz inoculado se agitó después en un agitador rotatorio Gump a 224 ciclos por minuto y se incubó a una temperatura de unos 28°C durante 48 horas aproximadamente.

En la tercera etapa de desarrollo, se colocaron cuatro litros del medio inóculo descrito en la Tabla 9 en un fermentador de banco de 7-1/2 litros y se esterilizaron durante 30 minutos a unos 121°C. El fermentador de banco fue inoculado partiendo del matraz de un litro agitado, y se hizo pasar aire a 4,0 litros en condiciones normales, por minuto. El fermentador estaba equipado con cuatro pantallas desviadoras y un agitador con dos impulsores de 7,5 cm de diámetro cada uno. El agitador se hizo funcionar a la velocidad de 500 rpm. La fermentación se llevó a cabo a unos 28°C durante 48 horas.

Finalmente se colocaron a un fermentador a escala de planta piloto de 40 litros, 30 litros de me

2.11.72



dio de cultivo que tenía la composición descrita en la Tabla 10 que figura a continuación, y se esterilizó durante 30 minutos a unos 121°C.

Tabla 10

	<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
	Líquido de macerado de maiz (55% de sólidos)	3,6
	Xilosa	1,0
	Sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.	2,0
10	Glicocola	0,1
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,2
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05

El fermentador a escala de planta piloto se inoculó después desde el fermentador de banco y se hizo pasar continuamente aire a la velocidad de 24,0 litros en condiciones normales, por minuto, bajo una presión de 1,05 kg/cm<sup>2</sup>. man. El fermentador a escala de planta piloto estaba equipado con cuatro pantallas desviadoras y el agitador estaba equipado con dos impulsores. Cada impulsor tenía un diámetro de hoja de 11,25 cm. El agitador se hizo funcionar a una velocidad de 485 rpm. La fermentación se llevó a cabo a unos 28°C durante 48 horas.

Una vez completada la fermentación, se midió la actividad de isomerasa del caldo producido y se en

406665



contró que era de 10 a 11 unidades por mililitro.

El procedimiento de producción de enzima se repitió después, pero se modificó el medio contenido en el fermentador de 40 litros para que contuviera al midón en vez de sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D.,  
5 encontrándose presente el almidón en la misma cantidad que los sólidos de jarabe de maiz a que reemplazaba. Este medio produjo enzima a una velocidad algo inferior, debido a que el organismo tenía que hidrolizar el almidón. Sin embargo, los resultados finales  
10 no indicaron ventaja particular alguna en el empleo de almidón en lugar de los sólidos de jarabe de maiz, en lo que concierne a la producción de enzima.

Ejemplo 2

15 Producción de enzima por la Cepa Mutante CPC 4

Los procedimientos de producción de enzima antes descritos, que se utilizaron con el mutante CPC 3, fueron repetidos utilizando la cepa mutante CPC 4. En general se obtuvo una producción de enzima comparable  
20 y no hubo indicación de que el reemplazamiento de los sólidos de jarabe de maiz por almidón en el medio tuviera algún efecto sobre la producción de enzima distinto de que el medio que contenía los sólidos de jarabe de maiz producía la enzima a una velocidad mayor, alcanzando su punto máximo unas 8 horas antes. En las  
25

2.11.72



cuatro fermentaciones, la actividad del caldo de cultivo estuvo comprendida entre unas 10 y unas 11 unidades por mililitro.

### Ejemplo 3

5                    Producción de enzima: Variación en el medio de cultivo y otros parámetros de operación

Se llevaron a cabo varias fermentaciones adicionales para producir caldo de cultivo con actividad de isomerasa.

10                    En varias de estas fermentaciones se modificó el medio de cultivo, en general en las etapas de 7-1/2 litros y 40 litros. Para el propósito de este conjunto de fermentaciones, se preparó un medio de fermentación que tenía la composición siguiente:

15                    Tabla 11  
Composición del Medio de Fermentación

<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
	<u>Medio B</u>
Líquido de macerado de maíz	4,0
20                    Xilosa	1,0
Glicocola	0,1
Nitrato amónico	0,2
Sulfato magnésico heptahidrato	0,05
Dextrosa	0,2
25                    Almidón	2,0

406665

-3



Se hicieron variaciones en los medios de fermentación para diferentes fermentaciones, mediante la adición de pequeñas cantidades de aditivos tales como más líquido de macerado de maiz, sólidos de jarabe de maiz de 15 E.D. y semejantes.

Todas estas fermentaciones produjeron con éxito medios de cultivo que contenían un nivel satisfactorio de actividad de isomerasa, durante las fermentaciones de las dos cepas mutantes, CPC 3 y CPC 4. Ninguna de las dos cepas requirió la presencia de cobalto en el medio para mejorar la producción de enzima y ambas cepas produjeron isomerasa de glucosa en cantidades mucho mayores que la cepa madre. Se obtuvieron actividades enzimáticas tan elevadas como 15 unidades por mililitro, que es sustancialmente más elevado que la actividad obtenida en general por fermentación con la cepa madre.

#### Ejemplo 4

##### Isomerización enzimática

Para demostrar la efectividad de la isomerasa producida por las cepas mutantes para convertir dextrosa en levulosa, se llevaron a cabo varias conversiones. La preparación de enzima empleada constaba de células totales congeladas de la cepa mutante CPC 3 o de la cepa mutante CPC 4. No se apreció que hubiera

2.11.72

406665



diferencias detectables en estas preparaciones enzimáticas.

Se llevó a cabo una serie de conversiones de hidrolizado de almidón de maíz de 95 E.D., utilizando varias dosificaciones de enzima diferentes. Las conversiones fueron llevadas a cabo a 70°C a un pH de 6,25. Se añadió sulfato magnésico al hidrolizado al nivel de 0,01 molar. La proporción de sustancia seca del hidrolizado fue de unos 600 mg/ml. Durante la isomerización, el hidrolizado se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno y el pH se mantuvo mediante titulación, como era necesario. El hidrolizado se agitó todo el tiempo mediante barras en el reactor de conversión, accionadas por un motor de agitación magnética.

Los resultados se describen en la Tabla 12 que figura seguidamente.

Tabla 12

Serie de dosificación sin cobalto

% de conversión de Hidrolizado de 95 E.D. en cetosa

20	Dosificación	Periodo de Conversión en horas			
		<u>16-18</u>	<u>40-44</u>	<u>64-66</u>	<u>88-90</u>
	0,8	17,7	30,2	35,2	38,1
	1,0	21,9	35,6	40,4	43,0
	1,2	24,7	37,5	41,3	42,0
25	1,4	26,0	40,1	43,4	-
	1,6	28,1	41,0	43,2	-
	2,0	33,4	43,2	45,2	-

2.11.72

406665



Como demuestran estos datos, una dosificación de enzima de 1,0 unidad por gramo es adecuada para producir suficiente levulosa, proporcionando un nivel de cetosa de 40% después de 66 horas de conversión sin cobalto; y una dosificación de enzima de 1,4 unidades por gramo es adecuada para la producción de 40% de cetosa después de un periodo de conversión de 42 horas.

Se llevaron a cabo con éxito varias conversiones adicionales a 65°C. Además, algunas de las conversiones fueron llevadas a cabo con éxito a valores del pH algo más elevados. Los resultados observados están resumidos a continuación.

Tabla 13

Conversión a 65°C sin cobalto

% de hidrolizado de 95 E.D. convertido en cetosa

Periodo de Conversión en horas

pH	Dosificación U/g	Periodo de Conversión en horas			
		22	43	69	88
6,25	0,7	16,5	24,1	30,0	36,9
	1,0	20,3	30,0	36,6	42,1
6,50	0,7	16,9	25,9	31,9	36,3
	1,0	23,4	33,3	38,8	42,6
6,75	0,7	18,9	28,2	33,6	37,2
	1,0	22,1	30,1	36,0	39,5

Los resultados observados parecen demostrar que el uso de la mayor temperatura de conversión de



70°C, es algo preferible. Los niveles de pH más altos no parecen producir ventaja alguna.

En resumen, se pone de manifiesto que las conversiones efectuadas a 70°C, a un pH de 6,25 aproximadamente y a una proporción de sustancia seca comprendida entre unos 600 mg/ml y unos 800 mg/ml, con una dosificación de enzima de 1,2 a 1,4 unidades por gramo, aproximadamente, durante un período de tiempo comprendido entre unas 40 y 48 horas y en presencia de magnesio a concentración aproximadamente 0,01 molar, en ausencia de cobalto y con entrada de nitrógeno, puede dar lugar a productos siruposos dulces altamente satisfactorios. Son de esperar composiciones de la clase siguiente :

15

Tabla 14Composiciones siruposas dulces

<u>Ingrediente</u>	<u>% en peso, base de sustancia seca</u>
Levulosa	40-44
20 Dextrosa	45-50
Sacáridos superiores	7-8

Estos datos demuestran que puede prepararse económicamente un jarabe de levulosa al 40% partiendo de un hidrolizado de 95 E.D. utilizando preparaciones

25

2.11.72

406665 -3



de enzima que proceden de los mutantes de la presente invención, sin emplear cobalto añadido.

5 Aun cuando la taxonomía de diversas cepas de los microorganismos mutantes de la presente invención ha sido descrita anteriormente, prestando alguna atención a la morfología, sera obvio para los expertos en la técnica que la producción de un mutante fisiológico puede ir acompañada por cambios morfológicos, pero que la variación de actividad bioquímica no está relacionada con un cambio morfológico específico. También será obvio que puede aislarse un mutante particular de fuentes naturales así como también de supervivientes de exposición a agentes mutagénicos artificiales.

15 Además, también será obvio que dentro del género Streptomyces, puede obtenerse el mismo tipo de mutante partiendo de diferentes especies de productores de isomerasa de xilosa, y que el tipo de mutante producido por exposición a agentes mutagénicos no depende del tipo de agente mutagénico utilizado.

20 Por consiguiente, aun cuando han sido descritas con detalle anteriormente la taxonomía de una cepa madre y las de dos cepas mutantes, procedentes de la madre por irradiación ultravioleta, las descripciones de los mutantes no caracterizan necesariamente to

2.11.72



das las cepas, variantes o sub-mutantes de los nuevos mutantes, ni distinguen necesariamente las nuevas formas mutantes de otras cepas de Streptomyces olivochromogenes.

5 Las cepas mutantes de microorganismos que pueden ser empleadas en la práctica de la presente invención pueden identificarse fácilmente, en general, aplicando los criterios siguientes :

- 10 1.- La taxonomía que es característica del género Streptomyces.
- 2.- La producción bajo condiciones de cultivo idénticas, en particular bajo aquellas condiciones descritas en esta Memoria, de por lo menos 50% más de actividad de isomerasa de xilosa que el Streptomyces olivochromogenes 21.114, y preferiblemente dos veces más.
- 15 3.- La producción de cantidades apreciables de isomerasa de xilosa cuando se cultiva en medios nutritivos desprovistos de xilosa y de materiales que suministran xilosa.
- 20 4.- Preferiblemente, además, la producción de cantidades apreciables de isomerasa de xilosa cuando se cultiva en medios
- 25

2.11.72

406665

-3



nutritivos desprovistos de cobalto añadi-  
do.

Las cepas mutantes particularmente preferi-  
das son las de S.olivochromogenes.

5 Las expresiones "un mutante de Streptomyces",  
y "una cepa mutante de S.olivochromogenes" y semejantes,  
como se usan en esta Solicitud, se entiende que inclu-  
yen aquellos cultivos de microorganismos del género  
Streptomyces que son identificables mediante los cri-  
10 terios anteriores. Estas expresiones, por consiguiente,  
incluyen las variantes que se presentan naturalmente  
y las variantes inducidas artificialmente de cepas que  
están específicamente caracterizadas en esta Memoria  
y que también son identificables mediante los crite-  
15 rios anteriores.

La preparación de enzima que se produce a  
partir de las cepas mutantes de microorganismos que  
pueden utilizarse al practicar la presente invención  
puede tomar, sustancialmente, cualquier forma deseada.  
20 Buenos resultados de isomerización han sido observados  
cuando se emplearon células deshidratadas con alcohol  
para efectuar la conversión, a una dosificación de 1,3  
a unidades aproximadamente de actividad por gramo de  
sustancia seca. Por ejemplo, cuando un hidrolizado de  
25 almidón de maíz de 30<sup>º</sup>Bé, de 95 E.D., se convirtió a

406665



1972

una dosificación de enzima de 1,3 unidades de actividad por gramo de sustancia seca a 70°C, utilizando células deshidratadas con alcohol, a pH 6,25 durante 46 horas, se consiguió un contenido de levulosa de 40%  
5 en 37 horas y el contenido final de levulosa del producto era de 41% aproximadamente. El producto siruposo dulce filtraba fácilmente y se refinaba bien.

Otras formas de preparación de enzima pueden ser usadas también eficazmente. Una forma de preparación de enzima preferida es el caldo de cultivo que se  
10 saca de un fermentador en base continua durante una fermentación continua, ya que esto representa una técnica de producción muy económica.

Las preparaciones de enzima obtenidas según  
15 la presente invención se utilizan generalmente para isomerizar dextrosa a un pH comprendido entre 6 y 7 aproximadamente y a una temperatura comprendida entre unos 60°C y unos 70°C. Sin embargo actúan efectuando isomerización fuera de estos intervalos.

20 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 17 de Septiembre de 1971, bajo el Número 181.639, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

2.11.72

406665



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 1ª.- Un procedimiento para la isomerización de dextrosa a levulosa con un preparado de enzima de isomerasa de xilosa que comprende someter la solución que contiene dextrosa a la acción del preparado de enzima de isomerasa de xilosa obtenido cultivando, en un medio nutriente una cepa mutante de un microorganismos del género Streptomyces,  
15 que está caracterizado por su capacidad para formar una cantidad apreciable de isomerasa de xilosa cuando se cultiva en un medio nutriente que está exento de xilosa y un material suministrador de xilosa.

20 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el preparado de enzimas se obtiene cultivándolo en un medio nutriente que suministra xilosa y en el cual la cepa uel microorganismo está caracterizada además por su capacidad para formar una cantidad sustancialmente mayor de isomerasa de xilosa cuando se cultiva en un  
25 medio nutriente que suministra xilosa.

406665



3ª.- Procedimiento según la reivindicación  
1ª, caracterizado porque el preparado de enzimas de isome-  
20 rasa de xilosa se obtiene cultivando, en un medio nutrien-  
te que suministra xilosa, una cepa mutante de un microor-  
5 ganismo del género Streptomyces que está caracterizado por  
su capacidad para formar una cantidad apreciable de isome-  
rasa de xilosa cuando se cultiva en un medio nutriente que  
está exento de xilosa y material que suministra xilosa y  
10 porque está caracterizado además por su capacidad para for-  
mar una cantidad sustancialmente mayor de isomerasa de xi-  
losa cuando se cultiva en un medio nutriente que suministra  
xilosa.

4ª.- Un procedimiento según la reivindicación  
1ª, caracterizado porque el microorganismo es una cepa que  
15 se selecciona de S. olivochromogenes ATCC No. 21,713, S.  
olivochromogenes ATCC No. 21,714, y S. olivochromogenes ATCC  
No. 21,715.

5ª.- Un procedimiento para la isomerización  
de dextrosa a levulosa.

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

25

406665



Esta Memoria consta de cuarenta y dos hojas  
escritas a máquina por una sola cara.

23.6.73

Madrid,

P.A.

5

*Aire*

10

15

20

25

LN/

19.6.73

*[Handwritten signature]*