

Int. Cl.: C13K. C12B
1

Nº 425.149

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España, sus
territorios y plazas de soberanía, a favor de:

ROQUETTE FRERES

sociedad anónima francesa, domiciliada en
62136-Lestrem, Francia, relativa a:

"PROCEDIMIENTO DE ISOMERIZACION ENZIMATICA DE
LA GLUCOSA EN FRUCTOSA"

Inventores: Patrick Leroy, Francis Devos y
Michel Huchette

Prioridad: Solicitud de patente en Francia nº
73 12864 de fecha 10 Abril 1973.

BAD ORIGINAL

MEMORIA DESCRIPTIVA

- La invención tiene por objeto un procedimiento de isomerización enzimática de la glucosa en fructosa, es decir un procedimiento del género de aquéllos en los cuales
5. las propiedades que poseen las enzimas producidas por ciertos microorganismos, cuando éstos son cultivados en un medio que contiene xilosa, permiten que estos microorganismos isomerizan la glucosa en fructosa cuando se ponen en contacto con la glucosa. - - - - -
10. Es conocido que ciertos microorganismos pertenecientes a las familias Pseudomonas, Bacillus, Lactobacillus y Streptomyces son capaces de producir dichas enzimas isomerizantes. - - - - -
15. Es conocido igualmente que la mayor parte de los microorganismos de los que se acaba de hablar presentan, a pesar del hecho de que son capaces de producir enzimas que isomerizan la glucosa, inconvenientes serios tales como los que residen, en particular, en dificultades de filtración después de isomerización y en dificultades de purificación
20. de los jarabes isomerizados obtenidos, debido a la presencia de sustancias coloides que provocan coloraciones (pigmentos secretados por el microorganismo no completamente eliminados del micelio durante el lavado de éste). - - - -

Dichos microorganismos conocidos presentan igualmente otros inconvenientes que residen ya sea en la dificultad de recuperar el micelio a la salida de un ciclo de isomerización, ya sea en la destrucción rápida de la actividad enzimática de dicho micelio, lo que impide hacerlo reaccionar por reciclado en una pluralidad de cargas sucesivas de jarabe de glucosa a isomerizar. - - - - -

5.

Sin embargo, se ha hallado que, de forma inesperada, un microorganismo particular, a saber una cepa perteneciente a la especie *Streptomyces violaceoniger*, no sólo era capaz de producir una enzima que isomerizaba la glucosa en fructosa, sino que además ya no presentaba dichos inconvenientes. - - - - -

10.

Este microorganismo, cuyos caracteres taxonómicos se describirán posteriormente, se ha depositado en el Centraalbureau voor Schimmel Cultures de Baarn (Holanda), bajo el nº CBS 409-73. - - - - -

15.

La invención tiene pues por objeto un procedimiento de isomerización enzimática de la glucosa en fructosa, caracterizado porque se emplea, como microorganismo productor de enzima isomerizante, una cepa de *Streptomyces violaceoniger* depositada en el Centraalbureau voor Schimmel Cultures de Baarn (Holanda), bajo el nº CBS 409-73, o mutantes de ésta. - - - - -

20.

Otras características aparecerán en la descripción

25.

que sigue y que se ilustra por medio de los ejemplos y de los planos correspondientes que se refieren a modos ventajosos de realización de la invención. - - - - -

En dichos planos: - - - - -

5. - las figuras 1, 2 y 3 son gráficas relativas al ejemplo 1 y muestran respectivamente la evolución, en función del tiempo t expresado en horas, por una parte, del pH (curva C_1 , fig. 1), por otra parte, de la cantidad Q de azúcares reductores presentes en el medio y expresada en g/l (curva C_2 , fig. 2) y finalmente, por otra parte, de la relación V_1/V_2 del volumen V_1 de microorganismo al volumen V_2 de cultivo (curva C_3 , fig. 3); - - - - -

10. - la figura 4 es igualmente una gráfica relativa al ejemplo 1 y muestra la evolución, en función del tiempo t expresado en horas, del valor del poder rotatorio absoluto α_D expresado en grados (curva C_4) y de la riqueza del medio en fructosa verdadera expresada en % (curva C_5). - -

20. La cepa de *Streptomyces violaceoniger* empleada según la invención se cultiva en condiciones aerobias en cultivo sumergido en el seno de un medio que contiene elementos nutritivos apropiados, así como xilosa como hidrato de carbono. El micelio así producido se recoge y puede emplearse en jarabes de glucosa. - - - - -

25. Se señala que los medios de cultivo utilizados para preparar un micelio de *Streptomyces violaceoniger* utilizable

en el marco del procedimiento según la invención contienen de 5 a 15 g de xilosa por litro, así como de 5 a 50 g por litro de sustancias nitrogenadas tales como, por ejemplo, soja, aguas de fermentación de maíz, residuos de aguas de vegetación de patatas, extractos de levadura, etc. - - - -

5.

Las condiciones de pH, de temperatura y de duración de este cultivo son, por lo demás, las siguientes: - -

- $5,0 < \text{pH} < 8,5$, preferentemente $5,5 < \text{pH} < 7,5$,

- $25^{\circ}\text{C} < t < 40^{\circ}\text{C}$, preferentemente $30^{\circ}\text{C} < t < 35^{\circ}\text{C}$,

10.

- duración de 24 a 48 horas.

La experiencia ha demostrado que este procedimiento de cultivo permite obtener en estas condiciones un micelio abundante, fácilmente filtrable y que presenta una buena actividad isomerizante. - - - - -

15.

En vistas a su empleo sobre un jarabe de glucosa, se filtra el micelio así producido, se lava con agua por pulverización y se recoge en forma pastosa. Puede conservarse en esta forma en frío (en general a una temperatura del orden de -20°C) o secado por liofilización, lo que permite

20.

igualmente conservarlo, pero en general se utiliza inmediatamente dispersándolo en el jarabe a isomerizar. - - - - -

El micelio filtrado y lavado se emplea en las condiciones generales de isomerización siguientes: - - - - -

- temperatura : 50 a 75°C .

- pH : 6 a 8,
- concentración del medio en glúcidos : 25 a 60%,
- CoCl_2 : 0,0 a 0,50 g/l,
- HgSO_4 : 0,0 a 2,4 g/l.

5. La duración depende de las condiciones y de la concentración de micelio empleadas. -----

La experiencia ha demostrado que los rendimientos de la transformación de glucosa en fructosa, por empleo del microorganismo según la invención, son del orden de 45% para una concentración de micelio de 1 volumen de caldo de cultivo por 1 volumen de solución de dextrosa a 50% en 24 horas. -----

Los caracteres taxonómicos de la cepa de *Streptomyces violaceoniger* según la invención son los siguientes: --

15. - Aspecto de las esporas : globulosas, de una dimensión de 0,9 a 1,2 micras y con paredes lisas o poco rugosas; -----

- Aspecto del micelio aéreo : esporulante gris puzco, que se licúa en manchas negras húmedas y que presenta ramificaciones de esporóforos monopodiales; -----

20. - Aspecto de las espirales : son cortas, están aglomeradas, presentan un o dos rizos; -----

- Aspecto del micelio vegetativo : es de blancuzco

a amarillento (hasta amarillo claro); - - - - -

- Es posible extraer un pigmento soluble que es rosa pálido y que se produce en la leche descremada; - - - -

5. - Cultivo sobre medio "hierro-peptona-agar" : sin pigmentos melanoideos (que tampoco aparecen en cultivo sobre tirosina-agar); - - - - -

- Acción diastásica : agar + ; almidón + ;

- Acción proteolítica : coagulación de la leche
buena peptonización

10. Licuación de la gelatina;

- Azúcares asimilados por la cepa : sacarosa

inositol

rhamnosa

rafinosa.

15. El conjunto de dichos caracteres permite afirmar que la cepa en cuestión pertenece a la especie *Streptomyces violaceoniger* (catálogos Wakeman & Curtis y Wakeman & Henrici); se señala, sin embargo, que el espectro de asimilación del carbono es algo diferente de aquélla. - - - - -

20. Desde luego, el procedimiento según la invención prevé el empleo de los mutantes de dicha cepa que pueden ser, por ejemplo, mutantes naturales o artificiales, pudiéndose obtener estos últimos, por ejemplo, por irradiación con rayos ultravioletas por tratamiento de la cepa de partida con

25. agentes químicos mutágenos tales como, por ejemplo, la ni-

troecuanidina y el sulfonato de etilmetilo. - - - - -

A continuación, se indican algunos ejemplos de realización del procedimiento según la invención. - - - - -

EJEMPLO 1.

5. a) Preparación del micelio - - - - -

En un fermentador de 20 litros, que contiene 15 litros de agua, se introducen 525 g de aguas de fermentación de maíz a 50% de extractos secos, 1050 g de xilosa y 15 g de sulfato de magnesio, esterilizándose todo. - - - - -

10. Se ajusta el pH a 6,8, antes de la esterilización, con amoníaco y se añaden 10 g de aceite de maíz para evitar un exceso de espuma. - - - - -

Después de una esterilización de 10 minutos a 120°C, el medio se siembra con 400 ml de un precultivo de 48 horas de *Streptomyces violaceoniger* que pertenece a la cepa CBS 409-73 contenida en un erlenmeyer de 2 litros. - - - - -

El fermentador está equipado de un sistema mecánico de agitación regulado a 600 vueltas/minuto y la aireación se regula a 5 litros de aire estéril por minuto. - - - - -

20. Las gráficas de las figuras 1, 2 y 3 muestran la evolución, en función del tiempo, del pH (fig. 1, curva C₁), de la cantidad de azúcares reductores presentes (fig. 2, curva

C₂) y del volumen de microorganismo por volumen de cultivo (fig. 3, curva C₃), habiéndose medido esta última magnitud por la altura del residuo obtenido después de centrifugación en una probeta graduada en condiciones normalizadas, a saber 5000 vueltas/minuto durante 10 minutos. - - - - -

5.

Resulta de la figura 3 que, después de 24 horas de cultivo, la cantidad de Streptomyces obtenida alcanza un máximo y ya no aumenta. - - - - -

Los 15 litros de cultivo se filtran sobre filtro Büchner provisto de una precapa de tierra filtrante; el Streptomyces recogido se lava con agua potable. - - - - -

10.

De esta forma, se recogen, sin dificultad, 800 g de células húmedas. - - - - -

b) Isomerización de la glucosa -

15.

Los 800 g de Streptomyces obtenidos anteriormente se dispersan en 15 litros de una solución de dextrosa a 500 g/kg de solución que contiene trazas de sales de magnesio y de cobalto, a saber 2,4 g/l de MgSO₄ y 0,24 g/l de CoCl₂.

20.

El pH se ajusta a 6,8 por medio de una solución de sosa y de sulfito de sosa y luego la temperatura de la suspensión se lleva a 65°C y el pH se mantiene al valor de 6,8 por medio de un pH-metro automático. - - - - -

En la tabla I siguiente se han reunido los valores

sucesivos del poder rotatorio absoluto, α_D , de la riqueza del medio en fructosa verdadera y del pH en función del tiempo - - - - -

TABLA I

Isomerización de una solución de dextrosa
al 50% pH 6,8 \pm 0,2 T 65°C \pm 1

Tiempo en horas	α_D	% de fructosa	pH
2	+ 4095	8,5	6,9
4	+ 2991	16,5	6,8
6	+ 1282	28,0	6,9
16	- 1381	45,5	7,0
20	- 1582	47,5	7,1

5. Con la ayuda de los valores reunidos en la tabla I se han trazado las curvas correspondientes, C_4 (α_D) y C_5 (% fructosa), de la gráfica de la figura 2 que permiten concluir la presencia de una actividad isomerizante importante, siendo la producción de 47,5% de levulosa en 20 horas de isomerización. - - - - -

10. EJEMPLO 2.

a) Preparación del micelio -

La preparación se ha efectuado en condiciones idénticas a las del ejemplo 1 con la diferencia de que las aguas de fermentación de maíz se han substituido por 300 g de pro

teinas procedentes de la floculación de las aguas de vege-
tación de patatas, ajustándose también el pH a 6,8 con azo-
nifaco. - - - - -

5. Después de 26 horas de fermentación (agitación de
600 vueltas/minuto - aireación 8 l/minuto) se han recogido,
después de filtración, 750 g de células húmedas de Strepto-
myces violaceoniger. - - - - -

b) Isomerización de la glucosa -

10. La torta de Streptomyces obtenida anteriormente se
dispersa en 15 litros de una solución de dextrosa al 90% en
peso, en las condiciones descritas en el ejemplo 1. Los re-
sultados obtenidos se reúnen en la tabla II. - - - - -

TABLA II

Tiempo en horas	alfa _D	% de fructosa	pH
0	52°5	0	6,8
5	+ 13°1	27,5	7,0
21	- 15°6	47,5	6,9

EJEMPLO 3.

15. Este ensayo evidencia la facilidad de filtración
de la cepa y sus posibilidades de reciclado. - - - - -

a) Preparación del micelio -

Dos fermentadores de 15 litros se han preparado en las condiciones generales descritas en el ejemplo 1. - - -

5. Las aguas de fermentación de maíz se han substituído por un hidrolizado proteolítico de caseína (1% de caseína, es decir 150 g. se ha hidrolizado en una solución de amoníaco por medio de proteasa alcalina durante 8 horas). -

10. Después de 24 horas de fermentación y de desaparición casi total de las sustancias reductoras, se obtiene un volumen de Streptomyces de 0,6 cm³/10 ml de cultivo después de 10 minutos de centrifugación a 5000 vueltas. - - - -

La filtración de estos medios de cultivo da respectivamente 580 g y 560 g de células de Streptomyces húmedas.

b) Isomerización con reciclado de la enzima -

15. Se ha procedido a 7 isomerizaciones consecutivas sobre 15 litros de solución de dextrosa al 50%. - - - - -

La primera se efectúa con 560 g de células de Streptomyces procedentes del fermentador 2. - - - - -

20. La segunda isomerización se efectúa sobre una nueva carga de 15 litros de jarabe de glucosa al 50% con el Streptomyces recuperado después de filtración del medio de reacción que resulta de la operación 1. - - - - -

Las isomerizaciones 3, 4, 5 y 6 se efectúan en otras

cargas de 15 litros de jarabe añadiendo, al micelio recuperado después de filtración de la operación precedente, 145 g de células frescas procedentes del fermentador 1. - - - -

5. Se ha efectuado una séptima y última isomerización sin adición de células frescas de *Streptomyces*. - - - - -

Los resultados de todas estas operaciones figuran en la tabla III siguiente. - - - - -

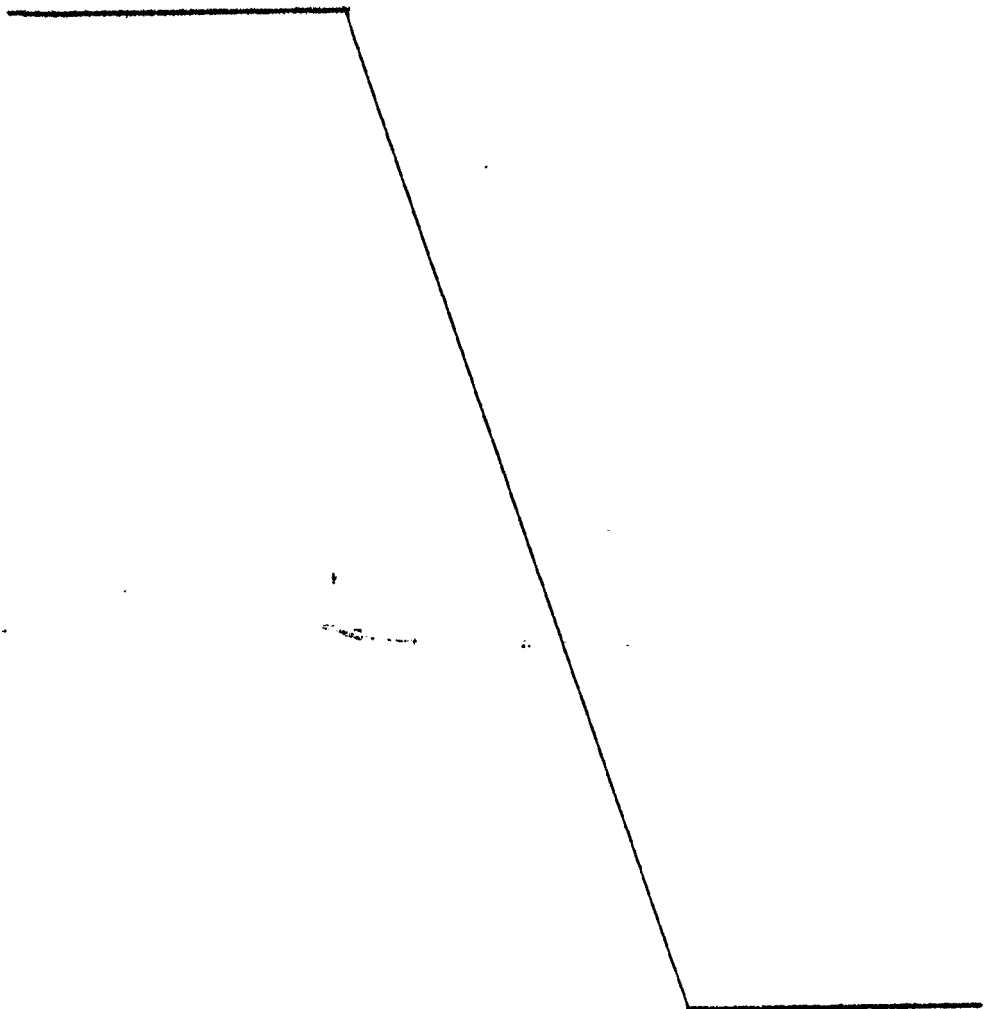


TABLE III

Siete isomerizaciones sucesivas efectuadas con el mismo micelio

Primera isomerización	Segunda isomerización		Tercera isomerización		Cuarta isomerización		Quinta isomerización		Sexta isomerización		Séptima isomerización	
	tiempo	% fruc tosa	tiem po	% fruc tosa	tiem po	% fruc tosa	tiem po	% fruc tosa	tiem po	% fruc tosa	tiem po	% fruc tosa
14 h	42,0		20 h	33,0	14 h	28,5					20 h	21,0
			27 h	39,0	38 h	42,5	27 h	42,0	38 h	42,5	45 h	40,0
											68 h	41,0

Esta manera de trabajar permite isomerizar 107 li-
tros de jarabe de glucosa al 50%, procediendo el micelio
de 30 litros de caldo de cultivo mientras que, sin recicla-
do, habría sido necesario utilizar el micelio procedente
de 107 litros de caldo de cultivo. - - - - -

5.

Las cifras reunidas en la tabla III permiten afir-
mar, además, que siendo la riqueza media de fructosa de los
siete jarabes de aproximadamente 42%, resulta claramente
la buena conservación de la actividad isomerizante del mico-
lio durante todo su empleo. - - - - -

10.

Como es evidente y como ya resulta por lo demás de
lo que precede, la invención no se limita en forma alguna
a aquéllos de sus modos de aplicación ni tampoco a aquéllos
de los modos de realización de sus diversas partes que se
han previsto más especialmente; abarca, por el contrario,
todas las variantes. - - - - -

15.

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España,
sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - -

20.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Procedimiento de isomerización enzimática de la
glucosa en fructosa, caracterizado porque se emplea, como
microorganismo productor de enzima isomerizante, una cepa de
Streptomyces violaceoniger que presenta los caracteres taxo-

nómicos siguientes: - - - - -

- Aspecto de las esporas : globulosas, de una dimensión de 0,9 a 1,2 micras y con paredes lisas e poco rugosas; - - - - -

5. - Aspecto del micelio aéreo : esporulante gris parásito, que se licúa en manchas negras húmedas y que presenta ramificaciones de esperóforos monopodiales; - - - - -

- Aspecto de las espirales : son cortas, están aglomeradas, presentan uno o dos rizos; - - - - -

10. - Aspecto del micelio vegetativo : es de blancuzco a amarillento (hasta amarillo claro); - - - - -

- Es posible extraer un pigmento soluble que es rosa pálido y que se produce en la leche descremada; - - - - -

15. - Cultivo sobre medio "hierro-peptona-agar" : sin pigmentos melanoideos (que tampoco aparecen en cultivo sobre tirosina-agar); - - - - -

- Acción diastásica : agar + ; almidón + ; - - - - -

20. - Acción proteolítica : coagulación de la leche
buena peptonización
licuación de la gelatina;

- Azúcares asimilados por la cepa : sacarosa

inositol
 rhamnosa
 rafinosa;

o una cepa mutante de esta cepa. - - - - -

5. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea, como microorganismo productor de enzima isomerizante, una cepa de *Streptomyces violaceoniger* registrada en el Centraalbureau voor Schimmel Cultures de Baarn (Holanda), bajo el nº CBS 409-73. - - - - -

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se emplea una cepa mutante de la depositada en el Centraalbureau voor Schimmel Cultures de Baarn (Holanda), bajo el nº CBS 409-73. - - - - -

15. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque por lo menos una de las cepas indicadas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se emplea en las condiciones siguientes: - - - - -

- temperatura : 50 a 75°C,

- pH : 6 a 8,

20. - concentración del medio en glúcidos : 25 a 60%
 en $CoCl_2$: 0 a 0,50 g/l
 en $MgSO_4$: 0 a 2,4 g/l

5.- "PROCEDIMIENTO DE ISOMERIZACION ENZIMATICA DE LA GLUCOSA EN FRUCTOSA". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de dieciocho hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras, y de cuatro figuras que la ilustran.

MADRID, 9 ABR. 1974
P.A. M. CURELL SUÑOL




Fig. 1.

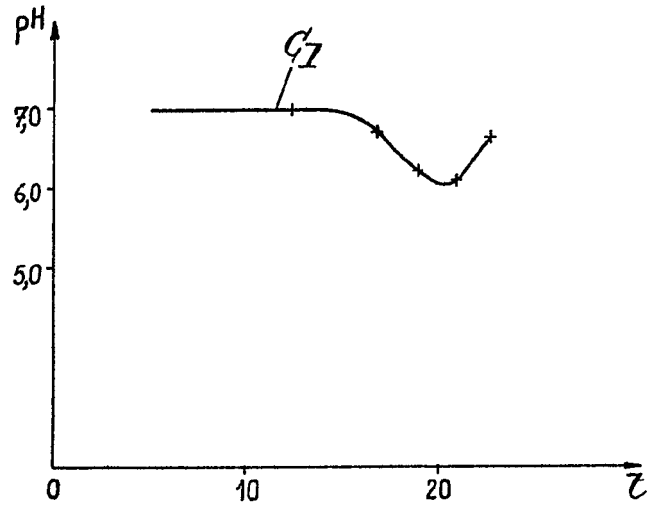


Fig. 2.

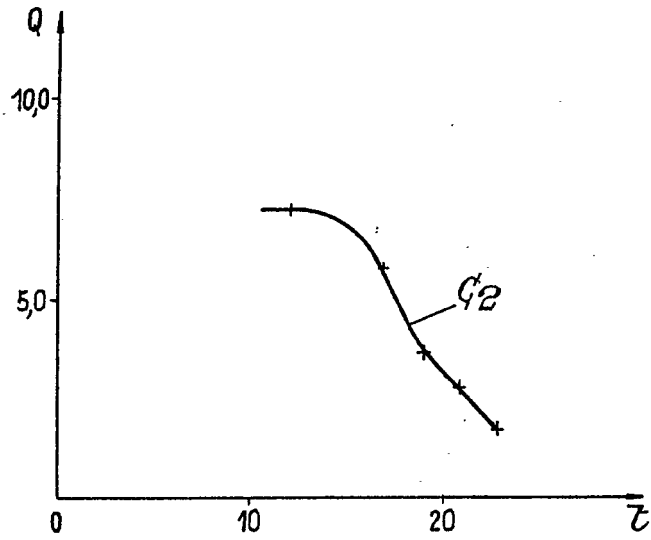
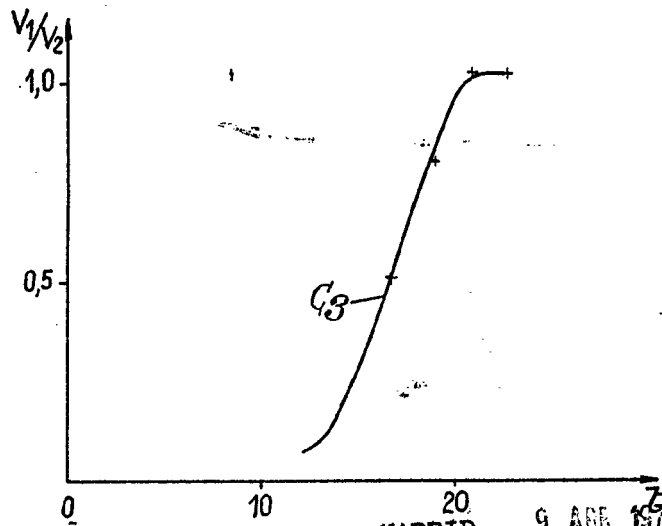


Fig. 3.

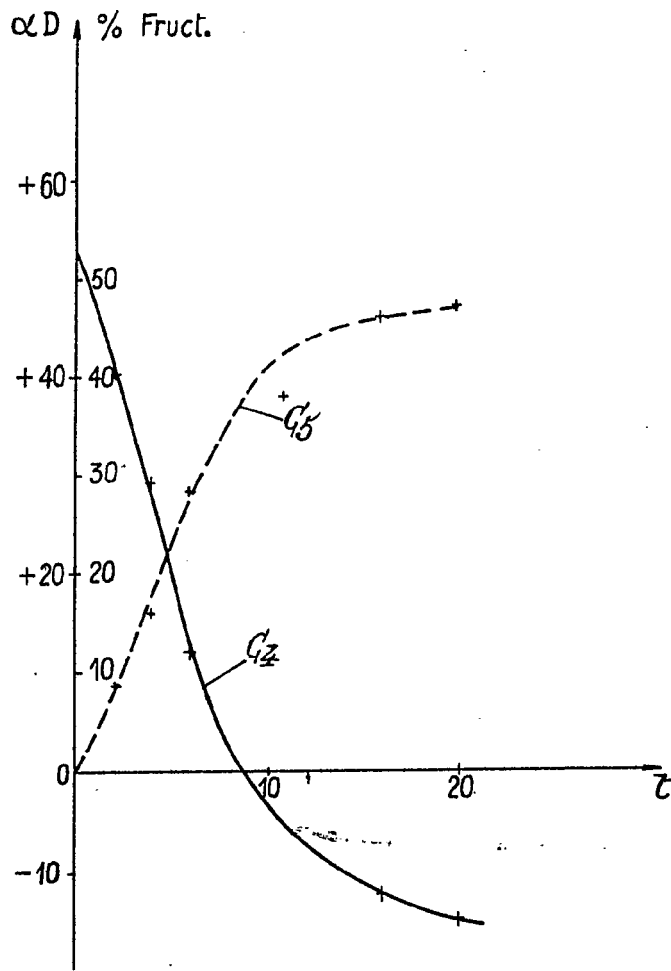


MADRID, 9 ABR 1974

P. A. M. CURELL SUÑOL

Man. In

Fig. 4.



MADRID, 9 ABR. 1974

P. A. M. CURELL SUÑOL

Man. Man