

433664

-9 ENE. 1975

P.- 59.408

47492/GL

Div

Int. Cl.: C07G

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S

entidad danesa

con domicilio en Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd,
Dinamarca

por: "UN METODO PARA LA ISOMERIZACION DE GLUCOSA A
FRUCTOSA"

(Clase Internacional C07G)

La invención se refiere a glucosa-isomerasa, a métodos para la producción de esta enzima y a la isomerización enzimática de glucosa a fructosa con glucosa-isomerasa.

5 Los jarabes que contienen una mezcla de glucosa y fructosa son ampliamente utilizados en la industria debido a su sabor dulce y su escasa tendencia a cristalizar. Tales jarabes se producen preferiblemente a partir de jarabes de glucosa utilizando una enzima para catalizar la isomerización de glucosa en fructosa. Es importante para 10 la economía de este procedimiento que los costes de la enzima sean bajos y que haya una formación despreciable de subproductos, los cuales tendrán que ser eliminados antes que pueda ser utilizado el jarabe.

15 Se pueden obtener enzimas capaces de isomerizar la glucosa a fructosa a partir de un gran número de especies de microorganismos diferentes, y las propiedades de las enzimas varían de una especie a otra. Las propiedades de las enzimas que son particularmente importantes para su empleo 20 en el procedimiento de isomerización, son la estabilidad a temperaturas altas y la actividad a valores bajos de pH.

En una isomerización enzimática de glucosa a fructosa, tienen importancia las condiciones siguientes:

pH: Se desea un valor de pH tan bajo como sea 25 posible con el fin de evitar la formación de subproductos ca

talizada por los álcalis, es decir, un pH inferior a 7, siendo adecuado un intervalo de pH de 5 a 7.

5 Temperatura: La enzima debería ser estable a una temperatura de aproximadamente 55°C a 75°C, que es la temperatura de reacción usual.

10 Solubilidad: En muchos casos, se desea utilizar las células del microorganismo que contienen la enzima intracelularmente para la isomerización; por consiguiente, es muy importante que la menor cantidad posible de la enzima se pierda en la mezcla de reacción durante la isomerización o durante la manipulación de las células después de la isomerización. Adicionalmente, es de importancia en la producción de la preparación de la enzima que las células puedan secarse fácilmente de tal manera que la enzima no se separe de las células.

15 En otros métodos, se desea una enzima soluble. Esta se puede utilizar bien sea directamente, o bien se puede hacer insoluble por copulación con un vehículo insoluble. Para este procedimiento, es importante que la enzima se pueda extraer fácilmente de las células.

20 Como el margen de precios entre la glucosa y la glucosa isomerizada es muy pequeño, es por lo demás extremadamente importante que el rendimiento en la producción de la enzima sea alto, a fin de que el precio de la preparación de la enzima pueda ser suficientemente bajo.

Se ha encontrado ahora que utilizando el método de aislamiento de acuerdo con esta invención, será posible aislar en condiciones reproducibles y con gran frecuencia organismos de la naturaleza, los cuales serán capaces de producir una glucosa-isomerasa que tiene una estabilidad térmica extremadamente satisfactoria y un pH óptimo muy bajo.

Los organismos aislados de este modo son bacterias aerobias en forma de bastoncillos, y formadoras de esporas. Dichos organismos deben clasificarse como una especie de Bacillus termófilo y más específicamente son identificables como una cepa de B. coagulans atípica, diferenciada de las cepas de B. coagulans típicas por su aptitud para desarrollarse a 65°C y para desarrollarse sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno.

El método de aislamiento de acuerdo con la invención consiste en incubar fuentes de microorganismos, p.ej. muestras de tierra vegetal, sobre medios que contienen solamente amoníaco como fuente de nitrógeno, xilosa como fuente de carbono, y los elementos trazas usuales como sales inorgánicas. La incubación tiene que tener lugar a una temperatura superior a 60°C, preferiblemente entre 60 y 65°C, para asegurar el desarrollo exclusivo de los microorganismos termófilos. Se puede añadir al medio agar en una concentración de 1,5 a 3%, con el fin de hacer más sencillo el aislamiento

de los organismos en desarrollo. Los organismos que se desarrollan en este medio se purifican por cultivo en placa sobre medio de agar de la composición arriba descrita y a la misma temperatura. Los cultivos puros así obtenidos se ensayan después en lo referente a actividad como isomerasa de glucosa utilizando un ensayo sencillo semicuantitativo, p. ej., como se describe más adelante en el Ejemplo 1, seleccionándose los cultivos que dan una reacción positiva.

10 La exposición razonada de la técnica completa del aislamiento consiste en establecer condiciones de desarrollo que favorezcan el desarrollo rápido de los microorganismos más adaptados para la utilización industrial y que ofrezcan una gran probabilidad de producir una glucosa-isomerasa.

15 La incubación a temperaturas elevadas, p.ej. 60°C, favorece el desarrollo de los microorganismos termófilos. Como clase, los microorganismos termófilos exhiben las altas velocidades de desarrollo deseadas para los procedimientos de fermentación industriales. Además de ello, las enzimas producidas por los microorganismos termófilos son termoestables.

20 La xilosa es la fuente de carbono, ya que todas las glucosa-isomerasas conocidas son básicamente xilosa-isomerasas. Muchos organismos que digieren la xilosa contendrán

una glucosa-isomerasa. La selección, por consiguiente, es un esfuerzo para localizar organismos que puedan utilizar xilosa como su única fuente de carbono.

5 El amoníaco, es decir, una fuente de nitrógeno inorgánico, se emplea para excluir aquellos microorganismos que requieran nitrógeno orgánico, con inclusión en particular de B. coagulans, una especie de microorganismo que, de lo contrario, satisfaría todas las condiciones del programa de selección. De hecho, B. coagulans es una fuente conocida de una glucosa-isomerasa de calidad, que posee una 10 estabilidad térmica relativamente satisfactoria y un pH bajo óptimo tanto para la actividad como para la estabilidad. Desgraciadamente, B. coagulans es costoso de cultivar debido a que sus requisitos de desarrollo incluyen vitaminas y 15 aminoácidos.

Los microorganismos aislados por el procedimiento de selección anteriormente descrito tienen cierto número de propiedades en común y, según se cree, pueden clasificarse en una sola especie. No obstante, la especie en cuestión 20 parece ser la de B. coagulans. Una identidad aparente entre B. coagulans y los microorganismos de la presente invención no es sorprendente, ya que las condiciones de selección son tan semejantes a las condiciones que seleccionarían B. coagulans que debería esperarse la obtención de microorganismos estrechamente afines al mismo. Además, B. coagulans es 25

una especie deficientemente definida, de la que ya se sabe que existen varios subgrupos. La bibliografía sobre B. coagulans reconoce que una investigación a fondo sobre B. coagulans demostraría probablemente que B. coagulans constituye varias especies diferentes de microorganismos afines. Quedando pendiente de realizar una investigación definitiva sobre B. coagulans, todo lo que se puede decir acerca del microorganismo de la presente invención es que se trata de un B. coagulans atípico caracterizado en su carácter atípico por ser capaz de desarrollarse a 65°C y capaz de desarrollarse sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno.

Una distinción bioquímica de importancia para la presente invención es que la enzima de glucosa-isomerasa del B. coagulans atípico difiere realmente de la glucosa-isomerasa de B. coagulans (típico), particularmente con relación a la estabilidad térmica y al efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad. La glucosa-isomerasa de la presente invención es más termoestable y su actividad a un pH comprendido entre 5 y 7 es igualmente satisfactoria, si no mejor. En definitiva, está presente una enzima diferente.

Para la producción de la glucosa-isomerasa de la presente invención, las bacterias se cultivan en condiciones aerobias sobre medios que contienen sales usuales y fuentes

de carbono y nitrógeno usuales a un pH comprendido entre pH 5 y pH 9. La adición de xilosa o de compuestos que contienen xilosa al medio es necesaria con el fin de inducir la formación de glucosa-isomerasa en las cepas brutas. Sin embargo, es posible aislar mutantes que producen glucosa-isomerasa sin inducción por xilosa. Cuando se cultivan tales microorganismos, se puede utilizar cualquier fuente de carbono metabolizable.

La temperatura de incubación para la fermentación está comprendida entre 40 y 65°C, usualmente alrededor de 50°C. Durante el cultivo se mantienen condiciones aerobias por soplado de aire a través del medio, p.ej. a un régimen de aproximadamente un volumen de aire por volumen de líquido y por minuto.

La enzima se forma intracelularmente, y el procedimiento de purificación consiste usualmente en cosechar las células por centrifugación o filtración y, si se desea, secado de la pasta cremosa de células por liofilización, secado por pulverización o por cualquier otro procedimiento que no destruya la actividad de la enzima. Antes del secado, las células se pueden tratar con soluciones de sales de cobalto, de tal modo que la preparación de la enzima contenga una cantidad de Co^{++} necesaria para activar la enzima.

Las células cosechadas se pueden tratar ulteriormente por calor a una temperatura comprendida entre aproximadamen

te 70 y 80°C durante un período de tiempo suficiente pa
ra destruir los sistemas de enzimas líticos en el interior
de las células.

5 Durante el cultivo, se puede determinar a interva
los de tiempo la cantidad de glucosa-isomerasa presente
en las células por determinación de la cantidad de fructo-
sa formada a partir de la glucosa en condiciones normalizada
das. Cuando ya no se observa aumento alguno de actividad, se
cosechan las células.

10 Si se desea un producto enzimático soluble, será
posible conducir la fermentación de tal manera que la mayor
parte de la enzima se separe de las células, pasando al caldo
de fermentación. Esto puede hacerse, por ejemplo, elevando
la temperatura de fermentación a 60°C durante el período
15 total de fermentación o sólo durante la última parte del mismo
mo.

A partir de este caldo se puede producir una pre
paración de enzima utilizando los métodos usuales para la pre
paración de enzimas extracelulares, esto es, purificando el caldo
20 do por centrifugación o filtración y concentrando la solución
que contiene la enzima por evaporación o por ósmosis inversa,
obteniéndose así un producto de enzima líquido, o por precipita
ción de la enzima separándola del caldo o del caldo concen-
trado por medio de sales o de disolventes solubles en agua, y
25 secado final del precipitado.

Se puede preparar también una enzima soluble a partir de las células aisladas dejando que las mismas sufran la autólisis, por adición de enzimas líticos, p.ej. lisozima, o por adición de agentes tensioactivos, así como por ruptura mecánica de las células por medios tales como ultrasonidos, o por el empleo de dispositivos mecánicos de homogenización. Se pueden producir preparaciones de enzimas a partir de células tratadas de este modo por los métodos arriba descritos.

Normalmente, los microorganismos producirán cierto número de esporas durante la fermentación. Si se desea una preparación exenta de esporas, debería utilizarse un mutante asporogénico para el cultivo. Los métodos para el aislamiento de mutantes asporogénicos son bien conocidos en la técnica y es fácil aislar este tipo de mutantes.

Si se desea, la preparación de enzima de acuerdo con la invención puede estar embebida en una matriz o insolubilizada por cualquier método conocido en la técnica que no destruya la actividad enzimática.

La enzima de la presente invención posee propiedades que son muy favorables para la isomerización de la glucosa en las condiciones comerciales favorables de pH 5 a 7. Puede utilizarse desde 55 a 85°C sin merma sustancial de actividad hasta valores de pH tan bajos como aproximadamente 5,0. Es extremadamente termoestable, reteniendo una gran parte

de su actividad a 85°C dentro de todo el intervalo de pH comprendido entre pH 5 y pH 7. Por contraste, la glucosa-isomerasa de B. coagulans conocida pierde actividad para temperaturas superiores a 70°C, no poseyendo casi ninguna actividad a 85°C. La superioridad en las propiedades de la enzima hace tanto más ventajosas las economías logradas por el cultivo de los microorganismos sobre nitrógeno inorgánico.

Para una mejor comprensión de esta invención, se presentan los siguientes ejemplos específicos de la misma.

10

Ejemplo I

Aislamiento de organismos isomerizantes de la glucosa de sustancias naturales

Una suspensión al 10% de tierra de jardín en agua esterilizada se extendió sobre placas que contenían un medio de agar de la composición siguiente en g por litro de agua destilada:

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3
20	K_2HPO_4	1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	KCl	0,5
25	FeSO_4	0,01
	Agar	20

27.2.74

Se trataron en autoclave, por separado, 5 g de xilosa por litro, y se añadieron asépticamente inmediatamente antes de extender la suspensión de tierra sobre las placas.

5 Se incubaron las placas a 60-65 °C durante dos días, y las colonias que se desarrollaron se transfirieron a un medio de la composición siguiente en g por litro de agua destilada:

10	Peptona	10
	Triptona	5
	Extracto de levadura	3
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	18
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
15	KH_2PO_4	7
	Agar	20

20 Se trataron en autoclave, por separado, 10-20 g de xilosa por litro, y se añadieron asépticamente inmediatamente antes de verter las placas.

Si el cultivo resultó ser impuro, se extendió de nuevo en forma de vetas sobre el primer medio y se transfirió de nuevo al medio rico. Se repitió este procedimiento hasta que se obtuvo un cultivo puro.

25 Los cultivos en el medio rico se incubaron durante

1 a 2 días a 60°C y se ensayaron luego en lo referente a su aptitud para isomerizar glucosa en fructosa de la manera siguiente:

5 Se pusieron en suspensión las células en NaCl al 0,9%. Se incubó 1 ml de la suspensión de células a 70°C con 1 ml de la solución siguiente:

Glucosa	80 gramos por litro
TRIS	0,1 mol por litro
10 cloroformo	2 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 gramos por litro
CcCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 gramos por litro

El pH se ajustó a 6,5 utilizando HCl.

15 Después de cuatro horas de incubación, se transfirió una gotita de la mezcla de reacción a una hoja de papel cromatográfico (Whatman Nº. 1) por medio de una pipeta Pasteur. Las gotitas se dispusieron de tal manera que quedase espacio para 50 a 100 gotitas por hoja de papel. Después
20 de secar, se humedeció el papel en la solución siguiente:

naftalindiol	250 mg
etanol	250 ml
HCl concentrado	20 ml

25 Después de secar durante al menos 30 minutos a la

temperatura ambiente, el papel se calentó a 60°C durante 1 a 20 minutos. Si la mezcla de reacción contenía al menos 0,5% de fructosa, se hacía visible una mancha parda después de este tratamiento.

5 Se aislaron 18 cultivos que daban reacciones positivas de fructosa utilizando este método. Los cultivos se depositaron en el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EE.UU. (NRRL) bajo las denominaciones NRRL B-5649 a NRRL B-5666.

10 Estas cepas tenían en común las propiedades siguientes:

Morfología:

Similar a la de las especies en el grupo de

B. subtilis.

15

Reacciones Bioquímicas:

Temperatura para el desarrollo: 40 a 65°C, óptima de 55 a 60°C.

20

El desarrollo es inhibido por concentraciones elevadas de proteínas (superiores al 3%) e hidratos de carbono (1%). Se produce ácido a partir de glucosa, xilosa, fructosa, ribosa y glicerina (no se forman gases); la arabinosa no sufre fermentación.

No se produce desarrollo alguno en NaCl al 3%.

25

Desarrollo a pH 5,7: Positivo.

Desarrollo sobre glucosa-agar nutriente, mejor que el desarrollo sobre agar nutriente. Desarrollo satisfactorio sobre agar de semilla de soja.

5 La hidrólisis de caseína y almidón fue positiva cuando se ensayó a 40°C, pero fue débil o negativa cuando se ensayó después del desarrollo a 50°C.

La hidrólisis de la gelatina fue negativa.

El desarrollo anaerobio en medio de glucosa, fue negativo (débil).

10

Ejemplo II

Producción de glucosa-isomerasa en matraces vibrantes

15

En matraces Erlenmeyer de 500 ml provistos de placas deflectoras se prepararon 100 ml de un medio que tenía la composición siguiente (en gramos por litro de agua corriente):

20

líquido de maceración de maíz	80
extracto de levadura	5
K_2HPO_4	1
$(NH_4)_2SO_4$	5
xilosa	4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05

25

La xilosa, el $MgSO_4$ y el $MnSO_4$ se trataron en auto

clave por separado y se añadieron asépticamente después de enfriar a la temperatura ambiente. Se ajustó el pH asépticamente a 7,0 utilizando NaOH 4N esterilizada.

5 Se inocularon los matraces con 1 ml de una suspensión de células en agua destilada esterilizada preparada por raspado de las colonias desarrolladas a partir de cultivos en pico de flauta en el medio rico descrito en el Ejemplo I.

10 Los matraces inoculados se incubaron en una mesa vibrante rotatoria (220 revoluciones por minuto) a 50°C. Después de 40 horas de incubación, se centrifugaron los contenidos de los matraces y las células obtenidas en el precipitado se utilizaron para la isomerización de glucosa de la manera siguiente:

15 En un reactor provisto de medios para mantener una temperatura constante, atmósfera de nitrógeno, control de pH y agitación, se pusieron 0,5 litros de una solución al 40% (peso/peso) de dextrosa monohidratada en agua destilada a la que se habían añadido 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,05 g
20 de $CoSO_4 \cdot H_2O$.

Se añadieron a la solución células que contenían glucosa-isomerasa procedentes de 1 litro del medio, y se llevó a cabo el procedimiento de isomerización en las condiciones siguientes: Temperatura, 80°C; pH, 6,2; tiempo, 10 horas.

25 La cantidad de fructosa formada se determinó por

polarimetría, y se determinó el grado de isomerización como % de fructosa formado/% de dextrosa inicial. Se obtuvieron los resultados siguientes:

	<u>Cepa NRRL N°</u>	<u>% de Conversión</u>
5	5649	35
	5650	44
	5651	42
	5652	44
10	5653	47
	5654	44
	5655	50
	5656	42
	5657	42
15	5658	38
	5659	38
	5660	42
	5661	42
	5662	51
20	5663	42
	5664	44
	5665	42
	5666	47
25		

Ejemplo III

Se cultivó *Bacillus termófilo* NRRL N°. 5650 durante una noche en caldo nutriente a 48°C. Se transfirió 1 ml de este cultivo a un matraz Erlenmeyer de 500 ml provisto de placa deflectora que contenía 100 ml del medio siguiente (en gramos por litro de agua destilada):

	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9
	KH_2PO_4	7
10	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	KCl	0,5
	FeSO_4	0,01
	antiespumante	0,1
15	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3

Se trataron en autoclave, por separado, 5 gramos de xilosa por litro, y se añadieron asepticamente antes de la inoculación.

El matraz se incubó en una mesa vibrante rotatoria a 48°C durante 1 a 2 días.

Se ensayó la actividad de isomerización de glucosa como se ha descrito en el Ejemplo II; el resultado fué una conversión del 32. .

25

Ejemplo IV

Aislamiento de bacterias mutantes que son ca-
paces de producir actividad de isomerización de glucosa
en medios exentos de xilosa.

5

Se cosecharon células que se desarrollaban
logarítmicamente en caldo nutriente, y se suspendieron
en tampón de TRIS-maleato de pH 6,0 que contenía 100 mi-
crogramos de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina por ml.
La suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos, des-
pués de lo cual las células se lavaron, se diluyeron y
se extendieron sobre cápsulas Petri que contenían agar
nutriente.

10

Al cabo de 1 a 2 días a 50-60°C, las colonias
de cepas mutantes se transfirieron a cápsulas Petri que
contenían un medio exento de xilosa de la composición
siguiente en gramos por litro de agua destilada:

15

extracto de levadura	30
agar	20

20

Se incubaron las placas hasta que se obtuvo un desarrollo
satisfactorio (1 a 2 días). Se determinó entonces la acti-
vidad de glucosa-isomerasa de las colonias utilizando el
método sencillo descrito en el Ejemplo I.

25

El número de mutantes encontrado fue elevado,

aproximadamente uno en 2000 a 3000 colonias ensayadas.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 12 de Enero de 1973, bajo el Nº 1773/3 (Provisional), se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

10

- REIVINDICACIONES -

15

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Un método para la isomerización de glucosa a fructosa, que comprende el empleo de una glucosa-isomerasa producida por una cepa de B. coagulans atípico capaz de desarrollarse con una fuente de nitrógeno inorgánico, llevándose a cabo la isomerización en condiciones anaerobias a pH comprendido entre 5 y 7 y a una

25

temperatura de 55° a 85°C.

2ª.- Un método para la isomerización de glucosa a fructosa.

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

Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

- 9 ENE. 1975

P.A.

Alberto de ELIZABURU
Por Voda.

2-1-75
VGD.