

439.848

PATENTE DE INVENCION

=====
ICI CASE B.27181/27526-SPAIN.

C13K

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ENZIMA DE ISOMERASA
DE GLUCOSA.

=====
COLOCADA
20 ENL. 1977
Solicitante: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED., entidad
inglesa, residente en Imperial Chemical House,
Millbank, Londres, S.W.1., Inglaterra.

=====
Esta invención se relaciona con la producción de
isomerasa de glucosa y con la conversión enzimática de glu-
cosa a fructosa.

En los últimos años se ha dirigido una gran inves-
5 tigación hacia el desarrollo de procedimientos para la con-

versión de glucosa a fructosa puesto que la fructosa es considerablemente más dulce. Los procedimientos más adecuados son aquellos en los cuales la conversión se lleva a cabo mediante la enzima isomerasa de glucosa. De éste modo, se ha prestado una atención considerable a los métodos para la producción de ésta enzima. Hasta el presente, los métodos sugeridos para la producción de la enzima han sido discontinuos.

Se ha encontrado ahora que cuando se produce isomerasa de glucosa mediante fermentación continua utilizando condiciones adecuadas, pueden mejorarse el rendimiento de enzima (tanto en términos de la cantidad de enzima producida por gramo de fuente de carbono y en términos de producción de enzima por unidad de volumen de fermentador) y su actividad en la isomerización de glucosa a fructosa.

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir enzima isomerasa de glucosa o un preparado enzimático que contiene isomerasa de glucosa mediante cultivo continuo de un microorganismo productor de isomerasa de glucosa en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono asimilable y nutrientes inorgánicos, bajo condiciones apropiadas para la producción de dicha enzima o preparado enzimático, y mediante recuperación continua de dicha enzima o preparado enzimático, en donde la concentración de una fuente nutriente, especialmente la fuente de carbono, en el medio de cultivo, se mantiene a un nivel tal que limite el procedimiento.

Por otra parte, y según la presente invención, se proporciona un procedimiento para isomerizar glucosa a fructosa utilizando una enzima de isomerasa de glucosa o un preparado enzimático que contiene isomerasa de glucosa, que se

5 ha producido mediante cultivo continuo de un microorganismo productor de isomerasa de glucosa en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono asimilable y nutrientes inorgánicos, bajo condiciones adecuadas para la producción de dicha enzima o preparado enzimático y mediante recuperación continua de dicha enzima o preparado enzimático, en donde la concentración de una fuente nutriente, especialmente la fuente de carbono, en el medio de cultivo, se mantiene a un nivel tal que limite el crecimiento.

10 En la memoria, la fuente nutriente cuya concentración se mantiene a un nivel tal que limite el crecimiento, se denomina nutriente de limitación.

15 El proceso de la invención para la producción de isomerasa de glucosa se inicia cultivando un microorganismo mediante un método discontinuo convencional. Cuando el cultivo crece se inicia la adición continua, satisfactoriamente, de nutrientes, siendo extraído el cultivo del fermentador a una velocidad similar a la cual se añaden los nutrientes. Nutrientes adecuados son las fuentes de carbono, nitrógeno, 20 fosfóro, magnesio, azufre, potasio y trazas de otros elementos. Frecuentemente, se incluye también una fuente de nitrógeno orgánico que puede contener factores de crecimiento, por ejemplo extracto de levadura o licor de maceración de maiz. Los nutrientes se añaden preferiblemente al cultivo 25 en concentraciones (% p/p del compuesto de fuente) dentro de las gamas (porcentajes en peso):

Fuente de carbono	- 0,05	- 10 %
Fuente de nitrógeno	- 0,001	- 3 %
Fuente de fósforo	- 0,01	- 0,5 %
Fuente de magnesio	- 0,001	- 0,2 %

Fuente de azufre	- 0,01	- 0,25 %
Fuente de potasio	- 0,01	- 0,25 %
Fuente orgánica de nitrógeno	- 0,01	- 5 %
Trazas de elementos	- en exceso	

5 En el proceso de ésta invención para la producción de isomerasa de glucosa, el nutriente de limitación, por ejemplo la fuente de carbono, está presente en concentraciones tales que el incremento adicional en el peso en seco de los microorganismos empleados, se limita solo por falta de
10 otras cantidades del nutriente de limitación.

En el procedimiento de la invención para preparar la enzima o preparado enzimático, puede emplearse cualquier microorganismo productores de isomerasa de glucosa. Microorganismos adecuados incluyen las cepas de los géneros Streptomyces, Arthrobacter, Mycobacterium y Curtobacterium. El último género comprende cepas previamente clasificadas en los géneros Brevibacterium y Corynebacterium y se define por K. Yamada y K. Komagata en J Gen Appl Microbiol, 18, 417-431, (1.972) en páginas 424-5. El empleo de cepas de género
15 Curtobacterium se describe en la solicitud británica copendiente nº 13.994/74.

Ejemplos de cepas adecuadas de Curtobacterium útiles en el proceso de la invención, son cepas productoras de isomerasa de glucosa, de Curtobacterium citreum por ejemplo NCIB 10702, Curtobacterium pusillum - por ejemplo NCIB 10354, Curtobacterium luteum - por ejemplo NCIB 11029, Curtobacterium helvolum - por ejemplo NCIB 10352 y Curtobacterium alvedum - por ejemplo NCIB 11030, todas ellas previamente clasificadas en el género Brevibacterium. También son útiles las cepas
25 Curtobacterium GS/4 y LW/3 cuyas características se describen
30

en la solicitud británica nº 13.994/74 (correspondiente a la solicitud de patente neocelandesa nº 177.026, solicitud de patente sudafricana nº 1.898/75 y solicitud USA nº de serie 561.662) y cuyos cultivos han sido depositados con las siguientes colecciones de cultivos, habiendo sido asignados con los siguientes números:

1. The National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Aberdeen, Scotland, UK - NCIB Accession Nos. NCIB 11072 y 11073 respectivamente.
2. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois - NRRL Accession Nos. NRRL B-8069 y B-8068 respectivamente.
3. The Fermentación Research Institute (FRI), Japan - FRI Accession Nos. FERM 2975 y 2974 respectivamente.

Ejemplos de cepas muy útiles de otros géneros son Arthrobacter nov. sp. cepas NRRL B 3724, 3725, 3726, 3727 y 3728, Streptomyces albus cepa ATCC 21132 y Mycobacterium neoaurum cepa ATCC 19.420.

En el método de producción de isomerasa de glucosa o de un preparado enzimático que contiene isomerasa de glucosa, el microorganismo productor de isomerasa de glucosa se hace crecer primero en un cultivo discontinuo antes de transferirse al cultivo continuo. Por ejemplo, se prepara un inóculo que contiene una cepa productora de isomerasa de glucosa, por ejemplo en un tubo inclinado de agar, y se utiliza para inocular un medio de cultivo adecuado. Allí, el organismo se hace crecer en cultivo discontinuo, preferiblemente durante 4 a 48 horas. Se utiliza entonces una parte alicuota o todo el cultivo para inocular un volumen mayor de

nutriente. Esto puede repetirse una o más veces antes de iniciar el cultivo continuo. Las células microbiales que contiene la enzima pueden separarse del medio de cultivo el cual se extrae continuamente del proceso de producción de enzima por cualquier medio conocido. Preferiblemente, se emplean todas las células para llevar a cabo la isomerización de glucosa a fructosa. Sin embargo, y si se desea, la enzima se puede extraer de las células mediante cualquier método adecuado o se puede utilizar el cultivo final mismo sin la separación de las células, en la conversión de glucosa a fructosa. Utilizando el cultivo final mismo, puede llevarse a cabo de éste modo la isomerización de glucosa a fructosa continuamente, preferiendo el cultivo continuamente desde el proceso de producción de isomerasa al proceso de isomerización.

El medio de cultivo para la producción de enzima o preparado enzimático, contiene preferiblemente, como fuente de carbono, un carbohidrato adecuado, por ejemplo glucosa y/o xilosa, un ácido orgánico adecuado o una sal del mismo, por ejemplo un acetato o un alcohol, tal como etanol. También puede contener nutrientes orgánicos complejos, tales como un caldo rico en vitaminas que comprende extracto de levadura, extracto de carne, licor de maceración de maíz, etc. La fuente de nitrógeno es adecuadamente amoníaco, una sal de amoníaco, un nitrato, un aminoácido o urea, y la fuente de fósforo es adecuadamente un fosfato. Otros elementos presentes preferiblemente, incluyen magnesio, potasio y azufre, por ejemplo añadidos como sulfato de magnesio y sulfato de potasio, y trazas de elementos tales como hierro, cobalto, zinc, cobre, manganeso, calcio etc. Las proporciones preferidas en las cuales están presentes los diversos ingredientes

5 en el medio de cultivo para la producción de la enzima, va-
riará en cierto grado en función del microorganismo empleado
y de otros factores. Las proporciones adecuadas en cualquier
caso particular pueden determinarse fácilmente por un micro-
biólogo competente.

10 Durante la producción de isomerasa de glucosa, el
medio de cultivo se mantiene preferiblemente a una temperatu-
ra dentro de la gama de 20 a 55°C, dependiendo la tempe-
ratura exacta del organismo utilizado. En el caso de una ce-
pa Arthrobacter, la temperatura es convenientemente de 25 a
37°C, en especial la de 25 a 33°C y más especialmente la de
28 a 32°C. Preferiblemente, el pH del medio se mantiene den-
tro de la gama de 4,5 a 8,5, especialmente de 6 a 8, dependien-
do también del organismo empleado.

15 Convenientemente, la tensión de oxígeno disuelto
en el medio se controla dentro de la gama de 0-150 mm de mer-
curio, prefiriéndose la gama de 1 a 100 mm de mercurio y
siendo especialmente adecuada la gama de 30 a 100 mm de mer-
curio.

20 El término tensión de oxígeno disuelto (DOT) sig-
nifica la presión parcial de oxígeno en el líquido - véase
el artículo de MacLennan y Pirt, J. Gen Microbiol. (1.966),
45, 286-302, en particular página 290. La velocidad de di-
lución es preferiblemente del orden de 0,05 a 0,4 hrs⁻¹.

25 La velocidad de dilución D es la velocidad de inter-
cambio de medio en el fermentador y se expresa por la rela-
ción de velocidad de flujo F al volumen medio total V del
fermentador, es decir $D = \frac{(F)}{(V)}$ y tiene la dimensión de hrs⁻¹.

30 En la isomerización de glucosa a fructosa por el
método de la invención, la temperatura de mantiene preferi-

blemente dentro de la gama de 20 a 90°C, especialmente 50 a 75°C. El pH del licor que contiene glucosa, que experimenta la isomerización, se mantiene preferiblemente en la gama de 5 a 9, preferiblemente en la gama de 7 a 8,5, utilizando si es necesario un sistema tampón adecuado, por ejemplo un tampón fosfato. Sin embargo, el empleo de sistemas tampones ha de ser evitado en lo posible en los procesos a gran escala. Otros activadores, tales como magnesio, cobalto o manganeso, en forma de iones, pueden estar presentes. La actividad enzimática se puede incrementar al máximo mediante el empleo de un co-factor enzimático, por ejemplo iones cobaltos añadidos en forma de una sal de cobalto, tal como cloruro de cobalto. Muy convenientemente, la enzima o preparado enzimático se puede inmovilizar, por ejemplo como se describe en la patente británica nº 1.368.650 en el proceso en el cual se utilizan células microbiales floculadas que contienen la enzima y se utilizan como parte de un proceso continuo en columna.

La glucosa misma puede estar presente en el licor en cantidades de hasta 70 %, preferiblemente 20 a 50%. Se puede incluir en el licor como glucosa o como un jarabe de glucosa que contiene otros azúcares, por ejemplo maltosa, maltotriosa y dextrinas.

La isomerasa de glucosa o el preparado enzimático que contiene dicha isomerasa de glucosa, se puede incluir en un licor en cantidades comprendidas entre 4 y 20 GIU (unidades de isomerasa de glucosa) por gramo de glucosa en la solución. Cuando se añaden cantidades en aumento de enzima de hasta varios miles de GIU por gramo de glucosa, aumenta la velocidad de la reacción de isomerización.

Preferiblemente la enzima o preparado enzimático se inmoviliza en un lecho fijo a través del cual se puede percolar el licor que contiene glucosa y convertirse en jarabe isomerizado.

5 La isomerasa de glucosa de la presente invención se puede ensayar con respecto a su actividad productora de fructosa, por el siguiente método de ensayo:

Isomerasa de glucosa - Método de ensayo

10 Se lleva a cabo un ensayo de la actividad de la enzima de isomerización de glucosa en la siguiente mezcla de reacción:

	Tampón fosfato 0,2 M (pH 7,5)	- 0,5 ml
	Glucosa 2 M	- 0,5 ml
	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 M	- 0,1 ml
15	CoCl ₂ 0,2 M	- 0,1 ml
	Solución de enzima	- 0,3 ml

La solución se completa a 2 ml con agua destilada y se incuba a 70°C durante una hora. La reacción se detiene añadiendo 4 ml de ácido perclórico 0,5 M y se determina la fructosa por el método de cisteína-carbazol (Dische Z & Borenfreund E., J. Biol. Chemi. 192.583 (1.951)).

20

Los niveles de actividad de por lo menos 64 unidades por ml de cultivo han sido observados bajo condiciones de ensayo normales.

25 La cantidad de enzima necesaria para producir un mg de fructosa a partir de glucosa por hora, a 70°C, bajo las condiciones de ensayo anteriores, se define como una unidad de enzima.

30 Empleando el proceso de la invención, es posible obtener buenos rendimientos de enzima, tanto basado en la

cantidad de fuente de carbono utilizada como basado en el volumen del fermentador. Igualmente, la enzima producida exhibe un elevado grado de actividad en la conversión de glucosa a fructosa.

5 La invención se ilustra por los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

10 Se hace crecer continuamente la cepa Arthrobacter nov. sp NRRL B-3728, bajo condiciones de limitación alternativa de carbono y nitrógeno, en medios de cultivo que contienen dos fuentes de carbono alternativas: glucosa y xilosa. Se evalúan los niveles de isomerasa de glucosa producida por el cultivo y se relacionan con las condiciones de cultivo.

El medio empleado es el siguiente:

15

1.596 gms/l PO_4^{3-}

2 ml 40 % $Mg SO_4$ /litro

0,075 g/l $Na_2 SO_4$

0,45 g/l $K_2 SO_4$

0,05 g/l extracto de levadura

20

Trazas de elementos (en ppm): Fe^{2+} -3; Cu^{2+} -0,075; Mn^{2+} -0,375; Zn^{2+} -0,345; Ca^{2+} -0,075; H_3BO_3 -0,384; Na_2MoO_4 -0,135.

En los experimentos utilizando limitación de nitrógeno, este medio se suplementa con 2,5 g/l $(NH_4) SO_4$.

25

En los experimentos con limitación de carbono, el pH se controla utilizando gas amoniacal el cual actúa también como fuente de nitrógeno.

30

La fuente de carbono se suministra como una solución al 40 % p/v de glucosa o xilosa y se bombea al fermentador separadamente del medio de sales minerales, para dar

una concentración final de 20 g/l carbohidrato.

Condiciones de fermentación

- 5 (a) En todos los casos se utiliza un fermentador de 5 litros, con un volumen de trabado de 2 litros aproximadamente.
- (b) Velocidad del agitador 1.500 rpm.
- (c) El pH se controla en 6,9 por adición automática de gas amoníaco, cuando se emplean condiciones de limitación de carbono, y de álcali (4N NaOH, 4N KOH) cuando se emplean condiciones de limitación de nitrógeno.
- 10 (d) La temperatura se controla automáticamente en 30°C.
- (e) La tensión de oxígeno disuelto se mide continuamente, se registra y se controla manualmente para que esté dentro de la gama de 50-150 mm de presión parcial de mercurio.
- 15 (f) Antiespuma; la espuma se controla sobre una base programada automática. La velocidad de adición de antiespuma varía con las condiciones de cultivo utilizadas.
- (g) La velocidad de dilución es de 0,11.

20 Ensayo de la enzima: Se llevó a cabo por el método de ensayo anteriormente descrito.

Determinaciones de proteínas: Se expresan como nitrógeno total x 6,25.

25 Muestreo: Se toma una muestra de cultivo de 250 ml, las células se centrifugan y se lavan y a continuación se liofilizan. Se efectúan ensayos con la muestra liofilizada. Se toman muestras a partir del recipiente depósito el cual se enfria en la mezcla de congelación. Es preferible tomar muestras directamente del fermentador puesto que no implica la separación de una muestra grande de fermentador.

30 Inoculación: Se utiliza un inóculo que ha sido

subcultivado solamente 8 horas antes de la inoculación.

En la tabla 1 se ofrece un resumen de las conversiones de carbono y rendimientos enzimáticos, que se obtienen en las diversas fermentaciones. A partir de la tabla 1 puede verse que no existe una diferencia apreciable en el rendimiento enzimático, expresado como unidades/gramo de peso en seco, cuando se altera el sustrato.

T A B L A 1

Fuente de carbono	Limitación	Conversión de carbono (%)	Rendimiento en enzima (unidades/g peso en seco)
xilosa	Carbono	34	1.150
xilosa	Nitrógeno	30	350
glucosa	Carbono	46	1.150
glucosa	Nitrógeno	31	350

Utilizando glucosa como fuente de carbono se lleva a cabo un experimento de cultivo, discontinuo, comparativo. En éste experimento, el medio nutriente utilizado es idéntico al utilizado para el cultivo continuo, con una concentración de glucosa inicial de 20 g/l, controlándose el pH en 6,9-7 utilizando gas amoníaco.

Condiciones de fermentación

- (a) El fermentador usado tiene un volumen de trabajo de 5l.
- (b) Velocidad del agitador, 750 rpm.
- (c) El pH se controla en 6,9-7 por adición automática de gas amoníaco.

- (d) La temperatura se controla automáticamente en 30°C.
- (e) La tensión de oxígeno disuelto se mide y registra, pero no se controla.
- (f) Antiespuma. La espuma se controla por adición manual de antiespuma, según sea necesario.
- (g) El tiempo de fermentación es de 30-35 horas.
- (h) El inóculo consiste en 1 % en volumen de un cultivo en matraz vibratorio.

Se llevan a cabo los ensayos de enzimas y determinaciones proteínicas, en la forma descrita para el cultivo continuo.

Los resultados son los siguientes:

Conversión de carbono, 35 %.

Rendimiento enzimático (unidades/gramo peso en seco), 730.

EJEMPLO 2

Se repite el ejemplo 1 utilizando la cepa Mycobacterium smegmatis ATCC 19420 con xilosa como fuente de carbono. Sin embargo, en éste ejemplo existieron las siguientes diferencias menores en las condiciones experimentales:

- (1) La temperatura se controla automáticamente en 37°C.
- (2) Se toman directamente muestras del fermentador. No se utilizó el método de muestreo del ejemplo 1 debido a la naturaleza eterogénea del cultivo de Mycobacterium Smegmatis.

Los resultados se indican en la tabla 2. Todas las cifras constituyen la media de por lo menos 4 determinaciones a régimen constante.

T A B L A 2

Fuente de carbono	Limitación	Rendimiento en enzima (unidades/g peso en seco)	Conversión de carbono, %
xilosa	Carbono	350	40
xilosa	Nitrógeno	95	35

N O T A

5 Descrita suficientemente la naturaleza del inven-
to, así como la manera de realizarse en la práctica, debe
hacerse constar que las disposiciones anteriormente indica-
das son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto
no alteren su principio fundamental. También se hace cons-
tar que el invento corresponde a dos solicitudes de patentes
10 presentadas en Inglaterra con los números y fechas siguien-
tes: 33578/74 de 30 de julio de 1.974 y 55994/74 de 30 de
diciembre de 1.974, que fue completada el 4 de julio de
1.975; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conce-
den los Convenios Internacionales en vigor , siendo lo que
15 constituye la esencia del referido invento por lo que se so-
licita Patente de Invención por 20 años en España. sobre:
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ENZIMA DE ISOMERASA DE GLUCOSA;
caracterizándose por lo siguiente:

20 1.- Procedimiento para preparar enzima de isome-
rasa de glucosa, o un preparado enzimático que contiene
isomerasa de glucosa, caracterizado porque un microorga-

5 nismo productor de isomerasa de glucosa se cultiva continuamente en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono asimilable y nutrientes inorgánicos, bajo condiciones adecuadas para la producción de dicha enzima o preparado enzimático, y se recupera continuamente la enzima o preparado enzimático, manteniéndose la concentración de una fuente nutriente en el medio de cultivo a un nivel tal que se limite el crecimiento.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuente nutriente, cuya concentración en el medio de cultivo se mantiene a un nivel que se limite el crecimiento, es la fuente de carbono.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque al medio de cultivo se añaden fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, magnesio, azufre, potasio y nitrógeno orgánico en una concentración (% p/p del compuesto de fuente) dentro de las gamas:

	fuelle de carbono	0,05 a 10 %
	fuelle de nitrógeno	0,001 a 3 %
20	fuelle de fósforo	0,01 a 0,5 %
	fuelle de magnesio	0,001 a 0,2 %
	fuelle de azufre	0,01 a 0,25 %
	fuelle de potasio	0,01 a 0,25 %
	fuelle de nitrógeno orgánico	0,01 a 5 %

25 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el microorganismo es una cepa de los géneros Streptomyces, Arthrobacter, Mycobacterium o Curtobacterium.

30 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fuente de

carbono es glucosa o xilosa.

6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el medio de cultivo se mantiene a una temperatura entre 20 y 55°C.

5

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el pH del medio de cultivo se mantiene entre 6 y 8.

10

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la tensión de oxígeno disuelto (DOT) dentro del medio de cultivo se controla dentro de la gama de 0 a 150 mm Hg.

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la tensión de oxígeno disuelto se controla dentro de la gama de 30 a 100 mm Hg.

15

10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la velocidad de dilución es de 0,05 a 0,4 horas⁻¹.

20

11.- Procedimiento para preparar enzima de isomerasa de glucosa, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 16 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 27 ENL 1977

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED

