

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

FC 20 JUL 1977

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES

11
21

22

NUMERO	460.368
FECHA DE PRESENTACION	4-7-1977

A1

PATENTE DE INVENCION

90 PRIORIDADES:		
81 NUMERO	82 FECHA	83 PAIS
76/07698-3	6-7-76	Suecia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C 12 D	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA ACTIVAR MICROORGANISMOS VIVOS INMOVILIZADOS"		
71 SOLICITANTE (ES)		
AKTIEBOLAGET FERMENTA		(LG 535-I ES)
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Pack, 152 00 Strängnäs, Suecia		
72 INVENTOR (ES)		
Per-Olof Larsson, Klaus Hermann Mosbach y Sten Albert Ohlson		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		(P-66.328)

1 - La presente invención se refiere a un método para
activar microorganismos inmovilizados. Particularmente, la
presente invención se refiere a un método para activar mi-
croorganismos vivos inmovilizados, aplicado a transformacio-
5 nes de esteroides, antibióticos y otros compuestos.

TECNICA ANTERIOR

Los microorganismos inmovilizados han atraído un
interés en aumento como catalizadores, en los pocos años úl-
10 timos (Biotechnol. Bioeng. 17, 1797-1804 (1975); J. Appl. Chem.
Biotechnol. 25, 115-141 (1975); Biotechnol. Bioeng. 12, 19-27
(1970)). Presentan las mismas ventajas de operación que las
inherentes en enzimas inmovilizadas (FEBS Lett. 62 (suple-
mento) E 80 - E 90 (1976)); se pueden utilizar de nuevo, son
15 bien adecuados para operación continua bajo condiciones con-
troladas, y además son relativamente resistentes a ataque
microbiano, ya que están protegidos por el polímero. Los mi-
croorganismos inmovilizados ofrecen la ventaja adicional de
que se evita el tedioso y costoso aislamiento de enzimas,
20 que la enzima es más usualmente estable debido a su locali-
zación en su "ambiente natural", y que usualmente no hay re-
quisitos de cofactor. Así, siempre que se puedan eliminar
las reacciones competitivas, los microorganismos inmoviliza-
dos son catalizadores muy prometedores. Sin embargo, en la
25 operación continua o en tandas repetidas del procedimiento
de transformación, la actividad declina bastante rápidamente
cuando se usan microorganismos inmovilizados. Este problema
no se ha resuelto hasta ahora de forma satisfactoria en re-
lación con los microorganismos vivos inmovilizados.

30

3087

1 AREAS DE APLICACION

En la presente solicitud de patente se considera especialmente una propiedad sin igual de los catalizadores de células enteras vivas inmovilizadas, concretamente la posibilidad de activación in situ de la actividad enzimática inmovilizada.

5 Son sustratos adecuados para transformaciones en las que se puede aplicar la activación según la invención:

- 10 1) esteroides, particularmente corticosteroides, por ejemplo cortisol
- 2) antibióticos, tal como penicilina G
- 3) otros compuestos tales como
- a. alcaloides, p.ej. solasodina, tomatidina
- b. ácidos orgánicos, p.ej. N-acetil-L-aminoácidos
- 15 c. carbohidratos, p.ej. glucosa, sorbosa
- d. bases de purina, nucleósidos y nucleótidos, p.ej. 6-cloropurina, ribósido de 6-cloropurina

20 La activación se puede aplicar a varios sistemas, tal como la transformación corticosteroide cortisol Δ^1 -deshidrogenasa, prednisolona. La reacción se puede catalizar por *Corynebacterium simplex* (*Arthrobacter simplex*) ocluido en poliacrilamida.

25 Entre las transformaciones adecuadas para la activación según la invención se podrían mencionar:

- 1) Δ^1 -deshidrogenación. Incorporación de un doble enlace en posición 1,2 de la molécula de esteroide. Ejemplo:

30 Δ^1 -deshidrogenación de cortisol y derivados de

- 1 cortisol, p.ej. cortisol a prenisolona,
 9 α -fluor-16 β -metilcortisol a 9 α -fluor-16 β -
 -metilprednisolona (betametasona),
 9 α -fluor-16 α -metilcortisol a 9 α -fluor-16 α -
 5 -metilprednisolona (dexametasona),
 6 α -metilcortisol a 6 α -metilprednisolona,
 6 α -fluor-16 α -metilcortisol a 6 α -fluor-16 α -
 -metilprednisolona (parametasona);
 9 α -fluor-16 α -hidroxicortisol a 9 α -fluor-16 α -
 10 -hidroxiprednisolona (triamcinolon),
 9 α -fluorocortisol a 9 α -fluorprednisolona,
 6 α , 9 α -difluor-16 α , 17 α -isopropilidendioxi-
 cortisol a
 6 α -9 α -difluor-16 α , 17 α -isopropilidendioxi-
 15 prednisolona.
- 2) 11 α -hidroxilación. Incorporación de un grupo
 hidroxilo en la posición 11 α de la molécula de
 esteroide. Ejemplo: transformación de cortexo-
 lona y derivados de cortexolona en 11 α -hidro-
 20 xicortexolona (epicortisol) y derivados de epi-
 cortisol.
- 3) 11 β -hidroxilación. Incorporación de un grupo
 hidroxilo en la posición 11 β de la molécula de
 esteroide. Ejemplo: 11 β -hidroxilación de corte-
 25 xolona y derivados de cortexolona, p.ej. corte-
 xolona a cortisol,
 9 α -fluor-16 β -metilcortexolona a 9 α -fluor-16 β -
 -metilcortisol,
 9 α -fluor-16 α -metilcortexolona a 9 α -fluor-16 α -
 -metilcortisol,

30

3087

- 1 9 α -fluorcortexolona a 9 α -fluorcortisol,
6 α -fluor-16 α -metilcortexolona a 6 α -fluor-
-16 α -metilcortisol,
6 α -metilcortexolona a 6 α -metilcortisol,
- 5 6 α ,9 α -difluorcortexolona a 6 α ,9 α -difluor-
cortisol,
6 α ,9 α -difluor-16 α ,17 α -isopropilidendioxi-
cortexolona a
6 α ,9 α -difluor-16 α ,17 α -isopropilidendioxi-
cortisol.
- 10 4) 16 α -hidroxilación. Incorporación de un grupo
hidroxilo en la posición 16 α de la molécula
de esteroide. Ejemplo: 16 α -hidroxilación de
cortisol y derivados de cortisol, p.ej. corti-
sol a 16 α -hidroxicortisol,
- 15 6 α -fluorcortisol a 6 α -fluor-16 α -hidroxicor-
tisol,
9 α -fluorcortisol a 9 α -fluor-16 α -hidroxicor-
tisol,
- 20 6 α ,9 α -difluorcortisol a 6 α ,9 α -difluor-16 α -
-hidroxicortisol.
- 5) Transformación de penicilina G. Transformación
de bencilpenicilina (penicilina G) a ácido 6-
-aminopenicilánico.
- 25 6) Eliminación de cadena secundaria. Ejemplo: trans-
formación de sitosterol a Δ^4 -androsteno-3,17-
-diona.
colesterol a $\Delta^{1,4}$ -androstadieno-3,17-diona.
- 7) Eliminación de 12 α -hidroxilo. Ejemplo: trans-
formación de ácido cólico a ácido quenodesoxi-
- 30

1 cólico.

Los organismos adecuados que se pueden usar en relación con la presente invención son:

5 1) Arthrobacter simplex (también llamado Corynebacterium simplex, por ejemplo ATCC 6946). Este organismo se puede usar para Δ^1 -deshidrogenación.

2) Rhizopus nigricans (también llamado Rhizopus stolonifer, por ejemplo ATCC 6227 b). Este organismo se puede usar para 11α -hidroxilación.

10 3) Curvularia lunata, por ejemplo ATCC 12017. Este organismo se puede usar para 11β -hidroxilación.

4) Escherichia coli, por ejemplo ATCC 9637. Este organismo se puede usar para producción de ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicilina G.

15 5) Aspergillus niger. Este organismo se puede usar para 16α -hidroxilación.

6) Streptomyces venezuela. Este organismo se puede usar para isomerización de glucosa.

20 7) Brevibacterium ammoniogenes. Este organismo se puede usar para transformación de bases de purina, nucleósidos y nucleótidos.

Los microorganismos se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como poliacrilamida, agar (2,5-15% en peso/vol), colágeno (célula : colágeno 1:1) o alginato cálcico (1-5%).

25 ESQUEMA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para impedir la disminución de actividad de microorganismos vivos inmovilizados, e incluso para reforzar la actividad en operación repetida o continua. Más en particular, la presente in-

1 -vención proporciona un método para activar microorganismos
vivos, inmovilizados aplicados a la transformación de este-
roides, antibióticos y otros compuestos en los que se usan
microorganismos inmovilizados, caracterizado por la adición
5 de peptona y glucosa a la mezcla de reacción. Preferiblemen-
te, la peptona se debe usar en el intervalo de concentra-
ción de 0,1-1,0% (peso/vol). También da buenos resultados
0,1% (peso/vol) de peptona y 0,2% (peso/vol) de glucosa en
combinación. La temperatura del procedimiento debe ser
10 20-30°C, y el procedimiento se debe efectuar bajo condicio-
nes aerobias.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1

15 En este experimento, el sistema estudiado fué la
importante transformación corticosteroide cortisol Δ^1 -des-
hidrogenasa, prednisolona. La reacción se catalizó con
Arthrobacter simplex (también llamado Corynebacterium simplex)
ocluido en poliacrilamida.

20 Se cultivaron células de A. simplex en un medio
de 0,25% de extracto de levadura, siendo inducida la acti-
vidad de Δ^1 -deshidrogenasa por adición de cortisol al cul-
tivo 12 horas antes de la recogida por centrifugación conti-
nua a 10.000 x g. Las células (5 g de peso en húmedo) se
25 suspendieron en 20 ml de tampón 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,5,
helado, y se mezclaron con 25 ml de solución acuosa de mo-
nómero helada, que contenía 7,13 g de acrilamida y 0,38 g
de N,N¹-metilen-bis-acrilamida. La mezcla se vertió en un
recipiente de polimerización tipo emparedado (hecho con dos
30 placas de vidrio de 20 x 20 x 0,2 cm, espaciadas 2 mm entre

1 sí con un trozo de tubo de látex), y se añadieron los cata-
lizadores persulfato potásico (50 mg) y tetrametiletildig-
mina (100 mg) en agua (1 ml). Se burbujeó nitrógeno gaseoso
a través de la suspensión, y la polimerización se inició
5 dentro de 2 minutos. La hoja de gel de poliacrilamida se
fragmentó en un mezclador, y los gránulos de gel (tamaño
medio 0,2 mm) se lavaron extensamente con tampón Tris, y
luego se almacenaron a -20°C , a la cual temperatura la pre-
paración era estable durante varios meses.

10 La actividad de 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogena-
sa del A. simplex inmovilizada se determinó convenientemen-
te por un método espectrofotométrico, y el único producto,
prednisolona, se identificó por cromatografía en capa del-
gada. Aproximadamente 40% de la actividad de deshidrogenasa
15 se retuvo durante el método de inmovilización (todas las
bacterias añadidas fueron inmovilizadas, y no se observó
desprendimiento de bacterias durante las incubaciones). Sin
embargo, los experimentos iniciales revelaron que la acti-
vidad declinaba bastante rápidamente en repetidas conversio-
20 nes discontinuas de altas cargas de cortisol, y esto solo
se podía compensar en grado limitado por adición del acep-
tor de electrones artificial menadiona. En vez de ello se
investigó la influencia estabilizadora de diversos nutrien-
tes y sales; los resultados se dan en las Tablas I y II.
25 En medios consistentes en agua o tampón la actividad dismi-
nuyó, mientras que en medios que contienen peptona y gluco-
sa no solo se conservó la actividad, sino que también aumen-
tó teatralmente a varias veces la actividad original. Se
eligieron el medio con 0,5% de peptona y el medio con 0,1%
30 de peptona + 0,2% de glucosa para nuevos estudios, y se

1 efectuó un experimento con repetida transformación discontinua. Ambos medios fueron aproximadamente igual de eficaces, y en la Tabla III se presentan los resultados obtenidos con el medio con 0,5% de peptona. Como se puede ver,
5 la capacidad de transformación aumentó notablemente en cada experiencia, de manera que aunque en la primera tanda se obtuvo un 100% de transformación tras 18 horas, la última tanda se completó en menos de 2 horas. La capacidad de transformación al final del experimento fué aproximadamente 0,5
10 g de esteroide/día/g de gel (peso en húmedo).

Ejemplo 2

Recientes experimentos preliminares muestran que la llamada técnica de pseudocristalofermentación también es
15 aplicable a A. simplex ocluido. Así, se añadió cortisol en cantidad (3,6 g/l) que excedía en mucho de su solubilidad en el medio, y se convirtió completamente, a aproximadamente la misma velocidad que en los experimentos con cortisol disuelto. El producto prednisolona que se separa por precipitación se podía aislar simplemente por filtración, tras
20 haber dejado sedimentar los gránulos de gel, bastante densos. Esta técnica permite reducir los volúmenes de medio en órdenes de magnitud, y también, por tanto, de nutrientes.

Tabla I

25

Efecto activador de nutrientes, tampones y sales en la actividad de 3-cetosteroides- Δ^1 -deshidrogenasa de A. simplex inmovilizado

1	Medio a)	Velocidad inicial de transformación b)				
		0	2	6	(%) tras 10	16 días
5	Peptona 0,5%	100	460	500	650	530
	Glucosa 0,2%	100	210	170	110	90
	K ₂ HPO ₄ 0,1M, pH 7,0	100	70	50	60	60
	Tris-HCl 0,05M, pH 7,0	100	100	70	70	30
	{ K ₂ HPO ₄ 0,1M, pH 7,0 ZnCl ₂ , FeCl ₂	100	50	25	15	10
10	{ K ₂ HPO ₄ 0,1M, pH 7,0 CoCl ₂ , MgSO ₄	100	40	40	0	0
	{ K ₂ HPO ₄ 0,1M, pH 7,0 MgCl ₂ , CaCl ₂	100	160	130	80	90
	{ K ₂ HPO ₄ 0,1M, pH 7,0 Peptona 0,5%					
15	{ Glucosa 0,2%					
	{ MgCl ₂ , CaCl ₂	100	560	650	600	550
	H ₂ O	100	60	40	40	20

- 20 a) la concentración de las sales inorgánicas MgCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, FeCl₂, CaCl₂ y MnSO₄ fué 1 mM
- b) la actividad del gel recientemente preparado se fija a 100%.

25 Se incubó gel de A. simplex (0,5 g) en 9,0 ml de medio como se indica, y se añadieron 0,5 ml de cortisol 20 mM (metanol). La suspensión se agitó en un agitador rotatorio a 25°C, y a intervalos de 48 h se reemplazó el medio por medio de nueva aportación que contenía cortisol. A los

30 intervalos indicados el gel se separó por filtración, se

1 -lavó y se sometió a determinación de actividad de Δ^1 -des-
hidrogenasa.

Tabla II

5 Efecto activador de peptona/glucosa sobre la ac-
tividad de 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa de A. simplex
inmovilizado a)

Medio	Velocidad inicial de transformación ^{b)} (%) tras				
	0	2	6	10	16 días
Peptona 1 %	100	290	320	380	550
0,5%	100	460	500	650	530
0,1 %	100	200	225	165	120
0,01%	100	125	30	0	0
15 { Peptona 0,1 %	100	250	225	240	350
{ Glucosa 0,2 %					
{ Peptona 0,01%	100	110	55	0	0
{ Glucosa 0,2 %					
20 Glucosa 0,2 %	100	210	170	110	90

a) Las condiciones experimentales se dan en la tabla I.

b) La actividad del gel recientemente preparado se fija a
100%

25

30

Tabla III

Transformación discontinua repetida de cortisol
a prednisona

Experiencia (nº)	Capacidad de transformación (mg de prednisona/hora/g de gel. (peso en húmedo))	Tiempo para 100% de conversión. (h)
1	3,1	17,4
2	5,0	10,8
3	13,5	4,0
4	18,1	3,0
5	26,3	2,1
6	27,1	2,0
7	27,1	2,0
8	29,6	1,8
9	30,8	1,8
10	31,7	1,7

Se suspendió gel de A. simplex (2,0 g) en 285 ml de peptona al 0,5%, pH 7,0, + 15 ml de cortisol 20 mM (metanol). El avance de la transformación se siguió espectrofotométricamente, y cuando se alcanzó el 100% de conversión a prednisona se lavó el gel y se volvió a incubar con medio de nueva aportación que contenía cortisol. La totalidad del experimento duró 4 días.

1

- 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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método para activar microorganismos vivos inmovilizados, aplicados a transformaciones de esteroides, antibióticos y otros compuestos, que incluye las operaciones siguientes: a) desarrollar los microorganismos en un medio nutritivo, b) inducir la actividad catalítica por adición de un precursor para la transformación, c) cosechar los microorganismos, d) inmovilizar los microorganismos en la matriz de gel, e) fragmentar la matriz de gel, y f) utilizar la matriz de gel fragmentada para transformaciones por tandas repetidas de esteroides, antibióticos y otros compuestos en un medio que contiene un substrato, en cuya transformación se intercambia el medio, después de la pasada de cada tanda, por un medio nuevo que contiene el substrato, efectuándose una adición de peptona, glucosa o una mezcla de peptona y glucosa al medio que contiene el substrato.

20

25

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que se transforma cortisol, o un derivado del mismo, a prednisolona o un derivado de ella.

30

3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que la transformación es una 11- ó 16-hidroxilación de un esteroide.

23058

4ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el

1 que el microorganismo es Arthrobacter simplex.

5a.- Un método según la reivindicación 1a, en el que la transformación es una Δ^1 -deshidrogenación.

5 6a.- Un método según la reivindicación 1a, en el que el microorganismo es atrapado en gel de poliacrilamida.

10 7a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1a-6a, en el que se incluye peptona o glucosa, o una mezcla de peptona y glucosa, en la mezcla de reacción, a 0,1-1,0% (peso/volumen).

8a.- Un método para activar microorganismos vivos inmovilizados.

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

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

Madrid, 29. MAY 1978

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poderes

