



CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

19 ES

11

21

22

NUMERO	463.344
FECHA DE PRESENTACION	19 Octubre 1977

10 A1

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
734.222	20-10-1976	EE.UU.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G	

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA ENZIMA QUE ISOMERIZA LA GLUCOSA"

71 SOLICITANTE (S)

R.J. REYNOLDS TOBACCO COMPANY (240432 Case U.S.734.222)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Main & Fourth Streets, Winston Salem, Carolina del Norte, EE.UU.

72 INVENTOR (ES)

Chin Kee Lee

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

AON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-67.160)

Concedida en virtud de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el tenido de la Memoria adjunta. UTILICÉSE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

UNE A.4 MOD. 3108

JGA

20 JUN 1978

POOR QUALITY

67160

La presente invención se relaciona con una enzima apropiada para su utilización en la isomerización de glucosa a fructosa así como también en la preparación de dicha enzima y la utilización de la misma en dicho procedimiento de isomerización.

Esto ha sido de considerable interés en los años recientes en la conversión enzimática de glucosa a fructosa, particularmente relacionado con la producción de jarabes que contienen fructosa a partir de almidón de maíz. La glucosa isomerasa utilizada para esta conversión puede obtenerse a partir de microorganismos pertenecientes a varios géneros inclusive Arthrobacter, Streptomyces, Bacillus y Actinoplanes. Otra fuente de glucosa isomerasa ha sido descrita recientemente en la patente norteamericana N° 3.956.066, que enseña la producción de glucosa isomerasa por miembros de las especies Flavobacterium devorans.

La presente invención involucra el descubrimiento que ciertas cadenas de las especies Flavobacterium arborescens son capaces de producir glucosa isomerasa en cantidades significativas.

Esta enzima es eminentemente apropiada para ser utilizada en el procedimiento de isomerización de glucosa.

Aunque los organismos aquí descritos se identifican como miembros de las especies Flavobacterium arborescens, deberá notarse que hay al presente alguna controversia en la clasificación de estos organismos. Las páginas 362-363 de la octava edición de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology indican que las especies F. arborescens están impropriamente clasificadas como miembros del género Flavobacterium. Una nueva clasificación y una nomenclatura revi-

sada no ha sido establecida por estos organismos. Por lo tanto, la nomenclatura existente se utiliza con el entendimiento que otras designaciones de géneros serán adoptadas eventualmente en la reclasificación de Flavobacterium arborescens. También deberá notarse que Flavobacterium devorans referida a la patente norteamericana N° 3.956.066 no es un candidato para reclasificación y por lo tanto actualmente se refiere a un género diferente.

Los organismos preferidos utilizados en conexión con la presente invención son cadenas mutantes aisladas a partir de cultivos ATCC 4358 que están disponibles de la American Type Culture Collection.

Las cadenas preferidas de F. arborescens capaces de producir cantidades significativas de glucosa isomerasa han sido depositados en la ARS Culture Collection of the USDA Northern Regional Research Laboratory en Peoria, Illinois permanente y están disponibles como cultivos NRRL B-11,022 y NRRL B-11,023.

Los microorganismos aquí descritos pueden ser cultivados en una variedad de medios conteniendo fuentes de carbón, nitrógeno y sales inorgánicas. Un medio típico incluye proteínas de animal hidrolizadas, licor de maceración de maíz, extracto de levadura de cerveceros, fosfato de dihidrógeno y potasio, fosfato de monohidrógeno y potasio y un carbohidrato apropiado. Los carbohidratos que pueden ser utilizados incluyen xilosa, glucosa, maltosa, sucrosa y lactosa así como también hidrolizados de xilano, almidón y celulosa. El pH inicial del medio crecimiento es alrededor de 7 y la fermentación se conduce en forma aeróbica a aproximadamente 30°C en un fermentador apropiado o en un frasco

con agitación. Actividad isomerasa máxima generalmente se logra en alrededor de 48 a 72 horas.

5 La actividad de isomerasa producida por los microorganismos se ensaya por incubación a 60°C durante 30 minutos de una mezcla que contiene 0.5 mililitros de una preparación que contiene enzima y 1.5 mililitros de una solución que contiene suficiente dextrosa, bufer de tricina (pH 8) y cloruro de magnesio para dar una concentración final de 1.0M, 0.1M y 0.03M, respectivamente. Al final del
10 período de incubación la reacción de isomerización se termina por adición de 0.5 mililitros de ácido clorhídrico 1.0N.

15 Luego de la centrifugación la fracción sobrenadante clara es diluida y la fructosa producida se determina por el procedimiento de L. Messineo y E. Musarra tal como se describe en Int. J. Biochem. 3(18), 691-699 (1972). La actividad isomerasa se expresa en microunidades con una microunidad de actividad definida como la cantidad de enzimas que producirá un microorganismo de fructosa por minuto bajo las
20 condiciones de ensayo arriba descriptas.

25 La cantidad de isomerasa producida por las cadenas preferidas bajo condiciones de cultivo favorables ha sido hallado como substancial y significativamente mayor que con otros microorganismos productores de isomerasa descriptos en el arte anterior. La producción de isomerasa por la variedad de cadenas preferidas depende considerablemente de las condiciones de cultivo utilizadas. Un resultado particularmente sorprendente e inesperado es la producción de isomerasa máxima que ha sido encontrada cuando se utiliza lactosa en el medio
30 de crecimiento. Por ejemplo, el cultivo de NRRL B-11,022 en

un medio que contiene 2% de lactosa proporciona 2892 micro-
unidades de isomerasa por mililitro de caldo de fermentación.
Por lo tanto las cadenas preferidas están además caracteri-
zadas y distinguidas de los organismos del arte anterior
5 por el hecho que son capaces de producir cantidades subs-
tanciales (por ejemplo 500 microunidades/mililitros de cal-
do o más) de actividad isomerasa cuando son cultivadas en
un medio nutriente que contiene lactosa como única fuente
de carbohidrato.

10 La producción de enzima muy substancial también ocurre
cuando no se adicionan carbohidratos al medio. Esto se de-
muestra por los datos ilustrados en la tabla 1 basados en el
cultivo a 30°C de cadenas de F. arborescens en un medio que
contiene proteína animal hidrolizada al 1% (Bacto-triptona
15 obtenida a partir de Difco Laboratories en Detroit, Michigan),
1% de licor de maceración de maiz, 1% de extracto de levadu-
ra, 1% de fosfato de monohidrógeno y potasio, 0,5% de fosfato
de dihidrógeno y potasio y 2% de carbohidrato.

TABLA 1

Producción de isomerasa por F. arborescens

<u>Carbohidrato</u> <u>en el medio</u>	<u>Horas</u>	<u>Actividad isomerasa en microunidades/ml.</u>		
		<u>ATCC 4358</u>	<u>NRRL B-11,022</u>	<u>NRRL B-11,023</u>
Ninguno	72	0	1042	1480
25 Xylosa	72	546	892	775
Glucosa	72	0	89	1123
Lactosa	72	0	2892	1679
Maltosa	72	-	1314	--
Sucrosa	72	-	1190	--

30 La isomerasa producida por F. arborescens exhibe activi-

dad útil en el rango de pH de alrededor de 6 a 10 y una temperatura de alrededor de 45 a 90°C. La tabla 2 ilustra los efectos del pH y la tabla 3 ilustra el efecto de la temperatura sobre la actividad isomerasa asociada con células obtenidas por cultivo de NRRL B-11,022 en un medio nutriente que contiene lactosa a 30°C durante 72 horas. La estabilidad de la enzima se indica en los datos de la tabla 4. Por los datos de las tablas 2 y 3, células de recolección fueron lavadas y resuspendidas en agua a la concentración original de las células en el caldo de fermentación. Los procedimientos de ensayo standarts descriptos anteriormente fueron utilizados para medir la actividad isomerasa excepto que el bufer se varió en los estudios de pH, la temperatura fue variada en los experimentos sobre efecto de la temperatura. Los estudios de estabilidad se resumen en la tabla 4 que involucra incubación de células lavadas en bufer tricina (pH 8) de 0.05M conteniendo cloruro de magnesio (0.004M) y ensayos de las células incubadas a intervalos especificados utilizando los procedimientos de ensayo standard.

TABLA 2

Efecto del pH sobre isomerasa a partir de NRRL B-11,022

<u>Bufer</u>	<u>pH</u>	<u>Actividad isomerasa en microunidades/ml.</u>
PIPES ¹	6.0	598
PIPES ¹	6.5	1204
PIPES ¹	7.0	1782
PIPES ¹	7.5	2202
TRICINE ²	7.5	2624
TRICINE ²	8.0	3016
TRICINE ²	8.5	3456
TRICINE ²	9.0	3408

¹PIPES es ácido monodosio 1,4-piperazindietanosulfónico.

²TRICINA es N-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]-glicina.

TABLA 3

5. Efecto de la temperatura sobre isomerasa a partir de
NRRL B-11,022 a pH 8.0

	<u>Temperatura en °C</u>	<u>Actividad isomerasa en microunidades/ml.</u>
	45	775
	50	1717
10	55	2776
	60	3500
	65	4400
	70	5104
	75	5960
15	80	6592
	85	7088

TABLA 4

20. Estabilidad de isomerasa a partir de NRRL B-11,022
a temperaturas elegidas

	<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Actividad isomerasa en microunidades/ml.</u>	
	<u>total en horas</u>	<u>Incubación a 60°C</u>	<u>Incubación a 70°C</u>
	24	2212	2340
25	96	2276	2244
	168	2276	2036
	240	2262	2092

30. Es evidente de los datos de la tabla 4 que la enzima es esencialmente estable para al menos 200 horas a un pH 8 y a 60°C tal como se determina por los ensayos con células lavadas que contienen la enzima. La preparación de enzima de

células lavadas es además caracterizada como que retiene al menos 85% de su actividad cuando se calienta durante 200 horas a 70°C y a un pH de 8.

5 La isomerasa producida por F. arborescens es muy efectiva para convertir glucosa a fructosa y varios procedimientos descriptos en el arte anterior pueden ser utilizados para dichas conversiones. Por ejemplo, la totalidad de las células puede ser directamente utilizada en una operación batch en la cual la preparación de enzima comprende material celular derivado de microorganismos o las células pueden ser inmovilizadas en un baño fijo por operación continua. Alternativamente, un extracto libre de células puede ser utilizado donde la isomerasa es liberada de la célula por medio de métodos conocidos y utilizadas como enzima soluble en un sistema de batch o inmovilizado para su utilización en un procedimiento continuo. Métodos para utilizar enzimas en tales formas son bien conocidos tal como se indica, por ejemplo, en la revista de W.R. Vieth y K. Venkatasubramanian publicada en CHEMTECH 3, 677-684 (1973) y 4, 47-55, 309-320 y 20 434-444 (1974).

15 Con respecto a la forma en la cual se utiliza isomerasa para la isomerización de glucosa, la reacción se lleva a cabo a una temperatura entre 45 y 90°C preferentemente entre alrededor de 60 y 75°C. El pH de la solución que contiene glucosa deberá ser mantenido entre alrededor de 6 y 10 y preferentemente entre alrededor de 6.5 y 8.0 de orden de minimizar la formación de productos de degradación a altas temperaturas. La enzima es efectiva con soluciones de glucosa relativamente puras así como con hidrolizados de almidón preparados por tratamiento ácido y/o de enzima. Las concentraciones de glucosa 25 30

de 30 a 60% en peso son preferidas para la etapa de conversión. La actividad de enzima se mejora por adición de pequeñas cantidades de iones de magnesio a la solución que contiene glucosa.

5 La solución que contiene fructosa obtenida de la isomerización puede ser refinada utilizando métodos convencionales tales como tratamiento con carbón activado y resinas intercambiadoras de iones.

10 Los siguientes ejemplos ilustrarán la utilización y ventajas de la presente invención.

EJEMPLO 1

En un frasco Erlenmeyer de 500 mililitros se colocaron 100 mililitros de medio nutriente que contiene lo siguiente:

	<u>Porcentaje</u>
15 proteína de animal hidrolizado	1.0
licor de maceración de maiz	1.0
extracto de levadura	1.0
K_2HPO_4	1.0
KH_2PO_4	0.5
20 lactosa	2.0

El medio arriba mencionado fue inoculado con inoculación recientemente preparada de F. arborescens NRRL B-11,022 y el medio inoculado fue agitado a 30°C utilizando un agitador de rotación. A la finalización de 72 horas las células
25 fueron cosechadas y lavadas. Un ensayo reveló la presencia de actividad isomerasa equivalente a 2892 microunidades por mililitro de caldo total.

EJEMPLO 2

30 La isomerización de glucosa a fructosa se llevó a cabo adicionando 10 gramos de células totales lavadas obteni-

das por el procedimiento del Ejemplo 1 a 500 mililitros de un jarabe de glucosa a 50% (peso/volumen) que era 0.01M con respecto al cloruro de magnesio.

5 El pH de jarabe se ajustó a 8.0 por medio de hidróxido de sodio y el jarabe fue incubado a 60°C con agitación suave. Luego de 20 horas el jarabe se analizó para la fructosa y se encontró que 45% de glucosa fue convertido a fructosa.

EJEMPLO 3

10 El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió, excepto que la xilosa fue utilizada en el medio nutriente en lugar de lactosa y la inoculación se preparó a partir de F. arborescens ATCC 4358. Luego de 72 horas las células fueron cosechadas y el ensayo indicó la presencia de actividad isomerasa equivalente a 546 microunidades por mililitro de caldo total.

EJEMPLO 4

15 El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió, excepto que la lactosa se reemplazó por glucosa en el medio nutriente y la inoculación se obtuvo a partir de F. arborescens NRRL B-11,023. Al final de 64 horas las células cosechadas se ensayaron y se encontró una actividad isomerasa equivalente a 580 microunidades por mililitro de caldo total.

EJEMPLO 5

25 La conversión enzimática de glucosa a fructosa fue efectuada por introducción de 9 gramos de células húmedas obtenidas por el procedimiento del Ejemplo 4 en 500 mililitros de una solución de glucosa a 50% (peso/volumen) que era 0.005M con respecto al cloruro de magnesio. El pH del jarabe se ajustó a 8.0 por medio de hidróxido de sodio y la solución se incubó a 60°C con agitación suave. El análisis de la solu-

30

1 ción luego de 27 horas reveló un contenido de fructosa del
38%.

EJEMPLO 6

5 Se cultivó F. arborescens NRRL B-11,022 a 30°C du-
rante 70 horas en un fermentador New Brunswick de 10 litros
utilizando el medio nutriente descrito en el Ejemplo 1. Las
células fueron cosechadas e inmovilizadas por el procedimien-
to de floculación descrito en la patente norteamericana Nº
3.821.086 para dar un agregado de células seco, floculado
10 que exhibe 75 microunidades por gramo de actividad isome-
rasa. Una columna de vidrio de 2,54 cm de diámetro que con-
tiene 5 gramos del agregado seco fue utilizado para la iso-
merización de glucosa continua. La columna se mantuvo a 60°C
y una solución de glucosa al 50% (peso/volumen) que es 0,005
15 M con respecto a cloruro de magnesio y ajustado a un pH
8,0-8,4 se pasó a través de la columna a una proporción de
flujo de 26 mililitros por hora. El efluente de la columna
se analizó para fructosa y el grado de conversión de gluco-
sa a fructosa se encontró como de aproximadamente 45%.

20

25

30

24107

REIVINDICACIONES

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:

1ª.- Un procedimiento para preparar una enzima que isomeriza la glucosa, caracterizado por cultivar un microorganismo perteneciente a la especie Flavobacterium arborescens en un medio nutriente bajo condiciones apropiadas para producir dicha enzima por dicho microorganismo y recuperar dicha enzima.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el microorganismo es Flavobacterium arborescens ATCC 4358.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el microorganismo es Flavobacterium arborescens NRRL B-11,022.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el microorganismo es Flavobacterium arborescens NRRL B-11,023.

5ª.- Un procedimiento para convertir glucosa a fructosa, caracterizado por contactar una solución que contiene glucosa con una enzima de isomerización de glucosa que exhibe actividad útil a una temperatura de 45 a 90°C y un pH de 6 a 10, dicha preparación es derivada de un microorganismo perteneciente a la especie Flavobacterium arborescens, y re-

1 cuperar dicho licor que contiene fructosa.

6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5ª, caracterizado por el hecho de que la enzima comprende un extracto libre de célula del microorganismo.

5 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5ª, caracterizado por el hecho de que la enzima comprende material celular obtenido a partir de dicho microorganismo.

10 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5ª a 7ª, caracterizado por el hecho de que el microorganismo es F. arborescens ATCC 4358, NRRL B-11,022 o NRRL B-11,023.

15 9ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5ª a 8ª, caracterizado por el hecho de que se lleva a cabo en una temperatura de aproximadamente 45°C a aproximadamente 90°C y a un rango de pH de aproximadamente 6 a 10.

10ª.- Un procedimiento para preparar una enzima que isomeriza la glucosa.

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

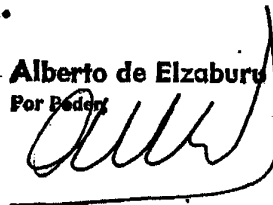
Esta Memoria consta de TRECE hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 27.OCT.1977

25

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poderes



30
24107
VAL

