

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 25321

(54)

Procédé d'obtention de glucose-isomérase à partir d'une souche *Streptomyces*.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 9/92.

(22)

Date de dépôt..... 28 novembre 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Bulgarie, 29 novembre 1979, n° 45 721.*

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 29 du 17-7-1981.

(71)

Déposant : INSTITUTE PO MICROBIOLOGIA, résidant en Bulgarie.

(72)

Invention de : Mitko Stoychev Popov, Galina Mihaylovna Djedjeva, Ivan Ognyanov Todorov et Nelly Stoycheva Stoeva.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

L'invention concerne un procédé d'obtention de l'isomé-
rase du glucose, ou glucose-isomérase, à partir d'une souche
5 de *Streptomyces*.

On sait que l'enzyme appelé glucose-isomérase permet de
transformer le D-glucose en D-fructose, qui trouve des ap-
plications de plus en plus larges dans l'industrie du trai-
tement des aliments et dans l'alimentation diététique dans
10 un certain nombre de pays développés. La glucose-isomérase,
en association avec un complexe d'enzymes amylolytiques
(α -amylase et gluco-amylase) permet d'obtenir des sirops
de glucose-fructose et de fructose directement à partir de
l'amidon, à l'aide d'enzymes.

15 Certains procédés d'obtention de la glucose-isomérase
sont connus depuis 1957, lorsque R.O. Marshall et E.R. Kooi
(29) démontrèrent pour la première fois la possibilité de
transformation directe du D-glucose en D-fructose au moyen
de cellules appartenant à la souche bactérienne *Pseudomonas*
20 *hydrophila* Nr. 491 et 492. Pour obtenir la glucose-isomé-
rase, des micro-organismes du genre *Streptomyces* et surtout
les espèces *Str. phaeochromogenes* (34,38), *Str. venezuelae*
(1,24), *Str. griseus* (23), *Str. wedmorensis* (3), *Str. albus*
(35), *Str. flavovirens*, *Str. achromogenes*, *Str. achinatus* (36), *Str. olivo-*
25 *cinereus* (20,24,26), *Str. achromogenes*, *Str. olivaceus*
(17,18), et autres, sont le plus largement utilisées. Outre
le genre *Streptomyces*, il existe d'autres producteurs actifs
tels que *proactinomyces* et *actinomyces* appartenant à d'au-
tres genres : *Nocardia*, *Micromonospora* (21,22), *Actinopla-*
30 *nes* (30,31), *Thermoactinomyces*, *Thermopolyspora* (37), et
aussi certaines souches bactériennes appartenant aux genres
Aerobacter (20), *Acetobacter* (28), *Lactobacillus* (25),
Bacillus (33), *Arthrobacter* (27), *Flavobacterium* (4), et au-
tres.

35 Les procédés déjà connus d'obtention de la glucose-iso-
mérase présentent un certain nombre d'inconvénients dûs
principalement au fait que les souches productrices combi-
nent rarement un fort degré d'activité de glucose-isomérase

avec une température et un optimum de pH favorables de l'enzyme. La température du procédé d'isomérisation, inférieure à 60 - 65°C, entraîne un danger de pollution microbienne de la colonie. L'augmentation de la température à 90°C diminue la stabilité de l'enzyme, provoque la coloration du sirop et certaines modifications de viscosité. En ce qui concerne l'application industrielle, le pH le plus favorable est de 6,5 à 7,0, car lorsque le pH est supérieur à 7,0 une isomérisation alcaline du glucose se produit avec formation de D-psicose et coloration du sirop, et un pH inférieur (moins de 5,5) provoque une dénaturation irréversible de l'enzyme.

L'objectif de la présente invention est de procurer un procédé d'obtention de la glucose-isomérase à partir d'une souche de *Streptomyces* qui présente une grande activité avec un optimum de température élevé et un pH favorable de l'enzyme.

La souche de *Streptomyces* sp. Nr. 1339, qui est un producteur de glucose-isomérase, a été isolée de terre de Bulgarie. 874 souches de *Streptomyces* ont été triées pour sa découverte. Le triage a été réalisé sur le milieu de culture synthétique modifié Nr. 1 d'après Krassilnikov, la sélection étant réalisée sur deux niveaux de substrat à l'aide de xylose et de xylane. Dans ces conditions, on a découvert 18 souches de *Streptomyces* qui peuvent développer et produire l'enzyme appelée glucose-isomérase. Parmi ces souches de *Streptomyces*, l'espèce Nr. 1339 s'est avérée la plus prometteuse à des fins industrielles. La souche a été déposée dans la collection du State Institute for Drugs Control, bul. Vladimir Zaimov Nr. 26, le 29 septembre 1979 sous le numéro 144, et elle possède les caractéristiques morphologiques et biochimiques suivantes.

Sur milieu de culture 1 avec une source minérale d'azote (d'après G.F. Gause et ses collaborateurs), les colonies ont habituellement une forme ovale, avec des bords informes, plates avec un centre convexe en forme de dôme et légèrement pliées. Les sporanges sont en spirale avec pas plus de 1 à 3 spires. Sur certains milieux de culture, des corémia se forment. La croissance est bonne. Les spores sont

allongées avec des extrémités nettement découpées et une surface inégale. Leur taille est de 0,4 à 0,9 micron de longueur et de 0,3 à 0,6 micron de largeur. Les extrémités ont des angles bien marqués. Dans certains cas, les spores sont légèrement concaves au milieu. Elles se forment par fragmentation. Les colonies sont ovales, avec des bords informes, plates, avec un centre convexe en forme de dôme, légèrement pliées, dans certains cas segmentées radialement.

On détermine la coloration du mycélium aérien et du mycélium substratique selon l'échelle de couleur de A.S. Bondartsev et l'échelle de Tresner et Backus.

Avec les différents milieux de culture, la couleur du mycélium aérien passe du gris clair au gris foncé ($a^4 - a^2$) suivant les sources de carbone et d'azote. Sur le milieu de culture 1 avec une source minérale d'azote (d'après G.F. Gause et ses collaborateurs), la couleur est gris souris (a^4) à gris foncé (a^2), et sur milieu de culture 2 avec une source organique d'azote (d'après G.F. Gause) la couleur est gris foncé (a^2). Sur des milieux de culture contenant différentes sources de carbone et d'azote, le mycélium aérien est gris à gris foncé.

Sur milieu 1 avec une source minérale d'azote (d'après G.F. Gause et ses collaborateurs), le mycélium substratique a une coloration citron clair à jaune orangé ($d^5 - d^2$). Sur milieu de culture 2 avec une source organique d'azote (d'après G.F. Gause et ses collaborateurs), le mycélium substratique est jaune or, et après culture prolongée, il devient presque châtain ($m^7 - o^7$).

Sur des milieux de culture contenant différentes sources de carbone et d'azote, le mycélium substratique est de jaune à jaune grisâtre vert.

Sur milieu de culture viande-peptone-gélose : croissance faible, mycélium aérien blanc, très peu abondant, mycélium substratique incolore.

Sur milieu de culture pomme de terre-glucose-gélose : croissance très bonne, mycélium aérien gris à gris foncé, mycélium substratique brun clair à brun foncé, jaune sur le bord de la colonie, pigment au centre jaune.

Sur milieu de culture Tchapek avec du saccharose : croissance moyenne, mycélium aérien gris clair, mycélium substratique beige.

- 5 Sur milieu de culture Tchapek avec du glucose : croissance moyenne, mycélium aérien grisâtre, mycélium substratique de couleur crème.

Sur milieu de culture avec du saccharose : croissance bonne, mycélium aérien gris, mycélium substratique jaune.

- 10 Sur milieu de culture amidon -gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris clair, coloration cendrée pale, mycélium substratique jaune à citron.

- 15 Sur milieu de culture amidon-ammoniac, d'après Mishustin : bonne croissance, mycélium aérien gris à gris foncé, mycélium substratique jaune à jaune clair.

Sur milieu de culture synthétique selon Krassilnikov : croissance faible à moyenne, mycélium aérien gris beige, mycélium substratique jaune.

- 20 Sur CPI selon N.A. Krassilnikov : croissance bonne, mycélium aérien gris laiteux, gris bleu, mycélium substratique jaune grisâtre vert.

Sur CPII selon N.A. Krassilnikov : croissance bonne, mycélium aérien gris, un exsudat blanc se sépare, mycélium substratique gris crème.

- 25 Sur CPIII selon N.A. Krassilnikov : croissance bonne, mycélium aérien gris, mycélium substratique jaune à jaune citron.

- 30 Sur CPIV selon N.A. Krassilnikov : croissance moyenne, mycélium aérien gris clair à grisâtre, mycélium substratique de couleur crème.

Sur CPV selon N.A. Krassilnikov : croissance faible, mycélium aérien blanc, mycélium substratique beige, couleur crème foncée.

- 35 Sur milieu de culture synthétique selon Vaxman : croissance moyenne, mycélium aérien blanc, gris sur des parties séparées, mycélium substratique jaune à orange.

Sur milieu de culture viande-amidon -gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris, mycélium substratique jaune.

Sur peptone-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris à gris foncé, mycélium substratique incolore avec une nuance du mycélium aérien.

- 5 Sur glucose-asparagine-gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris clair, mycélium substratique de couleur jaune à crème.

- 10 Sur glycérine-asparagine-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris clair, devenant gris au cours du vieillissement, mycélium substratique jaune foncé.

Sur tyrosine-gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris, dans certaines colonies jaune grisâtre, mycélium substratique jaune foncé à orange.

- 15 Sur tyrosine-caséine-nitrate-gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris cendré, mycélium substratique jaune.

Sur glucose-tyrosine-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris crème à gris, mycélium substratique jaune brun.

- 20 Sur saccharose-nitrate-gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris, mycélium substratique jaune crème.

Sur glycérol-calcium-malate-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris clair à gris, mycélium substratique jaune à orange.

- 25 Sur peptone-boeuf-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris, mycélium substratique incolore à beige.

Sur avoine-gélose : croissance très bonne, mycélium aérien gris, mycélium substratique jaune clair.

- 30 Sur tomate-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris foncé, mycélium substratique couleur terre cuite.

Sur acétate de plomb-gélose : croissance faible, mycélium aérien grisâtre, mycélium substratique jaune foncé brun.

- 35 Sur fer-peptone-gélose : croissance moyenne, mycélium aérien gris souris, mycélium substratique incolore avec une nuance grise du mycélium aérien.

Sur malte de levure-gélose : croissance bonne, mycélium aérien gris, mycélium substratique orange.

Tolérance de la souche vis-à-vis de NaCl. La souche présente une faible tolérance vis-à-vis de la concentration du chlorure de sodium dans le milieu. La concentration maximale est de 4 %. A cette concentration, la croissance est faible. Le mycélium aérien est blanc. Le mycélium substratique est jaune. Une concentration supérieure à 1 % a un effet négatif sur le degré de sporulation.

La souche peptonise le lait écrémé. Au début de la peptonisation, la réaction est acide, et au bout d'un certain temps elle devient alcaline.

La souche dilue la gélatine. Elle se développe très bien sur un milieu de saccharose, mais elle n'intervertit pas le saccharose. Elle se développe très bien sur un milieu amidon-gélose et elle hydrolyse bien l'amidon.

Elle ne décompose pas la cellulose et ne réduit pas les nitrates en nitrites. Elle libère de l'acide sulfhydrique. Elle se développe sur des pommes de terre. Le test d'hémolyse est positif et le test de la tyrosinase négatif.

On a constaté que sur un milieu de culture basique de Pridham et Gottlieb la croissance est bonne en présence des sources de carbone suivantes : glucose, fructose, lévulose, xylose, maltose, cellobiose, galactose, mannitol, arabinose, dextrose, ribose et glycérol.

La souche absorbe le salicine dans une faible mesure.

Elle n'absorbe pas les sources de carbone telles que le lactose, la sorbite, l'inosite, le saccharose et le raffinose.

On constate certaines différences de pigmentation du mycélium aérien et du mycélium substratique suivant la source de carbone.

On a constaté que sur un milieu de culture basique modifié de Pridham et Gottlieb, la croissance de la souche est bonne en présence des sources d'azote suivantes : NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 et carbamide.

La croissance est modérée sur un milieu de culture contenant du nitrate de sodium. La souche ne se développe

pas sur un milieu de culture contenant du nitrite de sodium.

On a observé une très bonne croissance de la souche sur des milieux de culture contenant les amino acides suivants : acide asparaginique, asparagine, proline, cystine, tyrosine. La croissance est modérée sur un milieu de culture contenant de la valine, de l'hydroxyproline, de la phénylalanine, de la leucine et de l'alanine. La souche ne se développe pas sur un milieu de culture contenant de l'acide glutamique.

Suivant la source d'azote, on constate certaines différences de pigmentation du mycélium aérien et du mycélium substratique.

Selon certaines caractéristiques, la souche de Streptomyces ressemble à Streptomyces griseoflavus, appartenant aux séries Gray d'après Bergey (1974) - Actinomyces griseoflavus du groupe Flavus d'après N.A. Krassilnikov - 1970. Cette dernière se distingue par un certain nombre de propriétés morphologiques, culturelles, physiologiques et biochimiques qui sont décrites dans la caractérisation de l'espèce par Bergey (1974) et par N.A. Krassilnikov (1970). Streptomyces griseoflavus, par exemple, possède des spores en batonnets allongés et de forme ovale avec une surface lisse ; il présente une tolérance vis-à-vis du chlorure de sodium, de 7 à 10 %. Il hydrolyse faiblement l'amidon. Il absorbe le saccharose et la sorbite et n'absorbe pas le galactose. Par conséquent, la souche de Streptomyces Nr. 1339 n'est pas identique à la souche similaire de Streptomyces griseoflavus (Actinomyces griseoflavus). C'est pourquoi on l'appelle Streptomyces sp. Nr. 1339, appartenant aux séries Gray d'après Bergey (1974) et au groupe Flavus d'après N.A. Krassilnikov (1970).

On cultive la souche productrice dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml contenant 50 ml de milieu de culture de fermentation, pendant 36 à 96 heures à une température de 24 à 36°C, avec un pH de culture initial de 6,5 à 9,0, sur un dispositif de secouage tournant à 180 - 320 tours par minute.

L'isomérisation du glucose en fructose au moyen de la glucose-isomérase de la souche *Streptomyces* sp. Nr. 1339 peut se faire par traitement direct avec le mycélium frais (séparé par centrifugation à 1 200 tours par minute et lavé trois fois avec un tampon de phosphate 0,05 M à pH 7,0) ou bien avec du mycélium sec (cellules séchées à l'air ou séchées à l'acétone), avec une solution d'enzyme (obtenue après désintégration ultrasonique ou autolyse du matériau cellulaire et séparation du liquide surnageant par centrifugation à 15 000 tours par minute), le résultat de la centrifugation de la culture contenant de l'isomérase extracellulaire ou des cellules immobilisées sur un support dur.

On détermine la quantité de fructose formé dans le mélange réactionnel en utilisant la méthode cystéine-carbazole (19), et on exprime l'activité de la souche en milligrammes de fructose par ml de liquide de culture ou bien en unités international de glucose-isomérase (G.I.U.). Une G.I.U. est égale à la quantité d'enzymes qui, à 70°C et dans une solution de glucose 1 M de pH 7,0 dans un tampon de phosphate 0,05 M, contenant $1 \cdot 10^{-4}$ M $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ et $1 \cdot 10^{-2}$ M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, transforme en une minute 1 μ mole de glucose en 1 μ mole de fructose.

Les avantages du procédé selon l'invention sont les suivants :

Pour obtenir la glucose-isomérase, on a utilisé la souche de *Streptomyces* sp. Nr. 1339, qui possède une grande capacité de bio-synthèse de l'enzyme (12 000 à 20 000 G.I.U.), c'est-à-dire qui est de 4 à 20 fois plus grande que l'activité des souches productrices décrites dans les brevets antérieurs (5 - 6). L'enzyme que l'on obtient se caractérise par un optimum de température élevé (70°C) à une faible concentration optimale de Co^{++} ($1 \cdot 10^{-4}$ M) et de Mg^{++} ($1 \cdot 10^{-2}$ M) dans le mélange d'isomérisation. Elle possède un optimum de pH favorable (7,0) et une thermostabilité considérable entre 40 et 65°C.

L'invention est illustrée par les exemples suivants :
Exemple 1.

On maintient la souche productrice dans des tubes à

essai avec de la gélose inclinée sur des milieux de culture ayant la composition suivante :

1. Milieu de culture à base de xylose :

5	Xylose	20 g
	Gélose	20 g
	KNO ₃	1,0 g
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
10	NaCl	0,5 g
	CaCO ₃	1,0 g
	FeSO ₄	0,001 g

eau en quantité suffisante pour faire 1 l.

2. Pomme de terre-glucose-gélose :

15 Extrait de pomme de terre obtenu à partir de 300 g de pommes de terre bouillies

	Glucose	10 g
	Gélose	20 g

eau en quantité suffisante pour faire 2 l.

20 Il est recommandé, pour entretenir la souche, de faire alterner les deux milieux de culture ci-dessus.

A une matière bien ensemencée résultant d'une culture de 10 à 15 jours sur un milieu de culture 1 ou 2 (1 est recommandé), on ajoute 6 ml de milieu de culture d'inoculation

25 ayant la composition suivante :

	Xylose	1,0 %
	Tryptone	2,0 %
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 %
	K ₂ HPO ₄	0,25 %

30 On procède à un lavage de la masse cellulaire et on place le tube à essai sur un dispositif de secouage pendant 24 heures à 30°C et à 240 tours par minute. A partir de la culture ainsi adaptée, on ensemence un milieu d'inoculation ayant la composition suivante :

35	Xylose	1,0 %
	Extrait de maïs	3,0 % (poids à sec)
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 %
	K ₂ HPO ₄	0,25 %
	gélose	0,1 %

Après 60 heures de culture dans les conditions susmentionnées, on introduit 5 % de l'inoculum dans un milieu de culture de fermentation ayant la composition suivante :

5	Xylose	1 %
	Extrait de maïs	3,0 % (poids à sec)
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 %
	KCl	0,0075 %
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,024 %

10 On procède à la culture dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml contenant 50 ml de milieu de culture de fermentation. On réalise la culture pendant 60 heures à 30°C sur un dispositif de secouage à 240 tours par minute. Le pH initial de la culture est de 8,5.

15 Après 60 heures de culture de *Streptomyces* sp. Nr. 1339, on obtient 140 à 220 g de biomasse humide pour 1 l de liquide de culture.

Exemple 2.

20 On procède à l'isomérisation du glucose en fructose au moyen de glucose-isomérase de la souche *Streptomyces* sp. Nr. 1339, à une température de 70°C, un pH de 7,0, en présence de CoCl₂.6H₂O à une concentration de 1.10^{-4} M, en présence de MgSO₄.7H₂O à une concentration de 1.10^{-2} M et une concentration de substrat de 1 M.

25 L'activité de la souche de *Streptomyces* sp. Nr. 1339 est de 130 à 215 mg de fructose par ml de liquide de culture, ou de 12 000 à 20 000 G.I.U. par litre de liquide de culture.

REFERENCES

1. Gratcheva I.M., Mositchev M.S., Gravistov A.B.,
Filippov S.A., 1977. Cert. d'auteur URSS n° 542763.
5 Bull. "Otkritia, izobretenia" N.2.
2. Gratcheva I.M., Mositchev M.S., Gravistov A.B.,
Filippov S.A., 1976. Cert. d'auteur URSS n° 534490.
Bull. "Otkritia, izobretenia" N.41.
3. Brevet n° 1361846, Angleterre
- 10 4. Brevet n° 3956066, USA
5. Brevet n° 3616221, USA
6. Brevet n° 3884988, USA
7. Brevet n° 1376787, Angleterre
8. Brevet n° 1284218, Angleterre
- 15 9. Brevet n° 534490, URSS
10. Brevet n° 534491, URSS
11. Brevet n° 542763, URSS
12. Brevet n° 2219713, BRD
13. Brevet n° 2247922, BRD
- 20 14. Brevet n° 2247922, BRD
15. Brevet n° 2018518, BRD
16. Brevet n° 1934461, BRD
17. Brevet n° 2223340, BRD
18. Brevet n° 2131984, France
- 25 19. Dische Z., Borenfreund E. 1951. J.Biol. Chem., 192, 583
20. Heady R.E., Jacaway W.A. Demande de brevet allemand n°
2225864.
21. Horwath R.O., Cole G.W. 1973. Brevet n° 2156622, France
22. Horwath R.O., Cole G.W. 1973. Brevet n° 2247922, RFA
- 30 23. Hsu T.Y., Shon S.C. 1964. Sheng Wu Hum Usuen Yu Sheng Wu
Li Isuen Pao, 4, 342.
24. Lizuka H., Ayukawa Y., Suekane M., Kanno M. 1971. brevet
n° 3622463
25. Kent C.A., Emery A.N. 1973. J. Appl. Chem. and Biote-
35 chnol., 23, 68.
26. Kooi E.R., Smyth R.J. 1972. Food Technol., 26, 9, 57
27. Loe C.K., Lawrence E.N., Long M.E. 1972. brevet n°
3645848, USA
28. Lliyd N.E., Lewis L.T., Logan R.M., Patel D.N. 1972.
brevet n° 3694314, USA

29. Marschall R.O., Kooi E.R. 1957. Science, 125, n° 3249, 648
- 5 30. Scallet B.L., Shieh K., Ehrenthal I. 1974. Stärke, 26, 12, 405
31. Shieh K.K., Lee H.A., Donnelly B.J., 1974. brevet n° 3834988, USA
32. Shieh K.K., Donnelly B.J., Lee H.A. 1974. brevet n° 3813320, USA
- 10 33. Skot G., Outtrup H. dans "5th Int. Ferment. Symp., 4th Int. Spec. Sym. Yeasts, Berlin, 1976, Abstr. Pap." - Berlin, 1976, 256.
34. Strandberg J.W., Smily K.L. 1971. Appl. Microbiol., 21, 4, 588
- 15 35. Takasaki Y. brevet n° 49981, Japon
36. Takasaki Y. 1971 brevet n° 361221, USA
37. Takasaki Y. 1975 brevet n° 50-175660, Japon
38. Tsumura M., Sato T., ibid., 1129

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention de glucose-isomérase, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver la souche productrice d'enzyme
5 Streptomyces sp. Nr. 1339 déposée sous le Nr. 144 au State
Institute for Drugs Control, pendant 36 à 72 heures dans un
milieu de culture en utilisant le xylose comme milieu d'ino-
cultation, la température étant maintenue entre 24 et 36°C,
le pH initial de la culture étant de 6,5 à 9,0, la tempéra-
10 ture d'isomérisation étant de 50 à 80°C, le pH étant de 6,0
à 9,0, en présence de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et avec une concentration
du substrat de 0,1 à 3 M.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que le milieu de culture que l'on utilise a la composition
15 suivante :

	Xylose	1,0 - 2,0 %
	Extrait de maïs	1,5 - 4,0 % (poids à sec)
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 - 0,2 %
	KCl	0,005 - 0,01 %
20	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,008 - 0,036 %.