



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: C 12 P 19/24
C 12 N 9/92

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ FASCICULE DU BREVET A5

635 128

②① Numéro de la demande: 6926/81

⑥② Demande scindée de: 12741/77

②② Date de dépôt: 19.10.1977

③⑩ Priorité(s): 20.10.1976 US 734222

②④ Brevet délivré le: 15.03.1983

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 15.03.1983

⑦③ Titulaire(s):
R.J. Reynolds Tobacco Company, City of
Winston Salem/NC (US)

⑦② Inventeur(s):
Chin Kee Lee, Winston-Salem/NC (US)

⑦④ Mandataire:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

⑤④ Procédé de transformation du glucose en fructose.

⑤⑦ On isomérise le glucose en fructose en soumettant une solution de glucose à l'action d'un enzyme d'isomérisation à une température de 45 à 90°C et à un pH de 6 à 10. L'enzyme est obtenu par culture d'une souche de *Flavobacterium arborescens*, de préférence la souche ATCC 4358, NRRL B-11 022 ou NRRL B-11 023, dans un milieu nutritif.

REVENDECATIONS

1. Procédé de transformation du glucose en fructose, caractérisé, en ce qu'on met une solution contenant du glucose en contact avec un enzyme d'isomérisation du glucose: a) produit par culture d'un micro-organisme appartenant à l'espèce *Flavobacterium arborescens* dans un milieu nutritif, dans des conditions permettant la production dudit enzyme par ledit micro-organisme et recouvrement dudit enzyme, et b) identifié par une activité enzymatique s'exerçant à une température de 45 à 90°C et à un pH de 6 à 10, et qu'on recueille une solution contenant du fructose.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on opère à une température de 45 à 90°C et dans un intervalle de pH de 6 à 10.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le micro-organisme mis en jeu est la souche *Flavobacterium arborescens* ATCC 4358.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le micro-organisme mis en jeu est la souche *Flavobacterium arborescens* NRRL B-11 022.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le micro-organisme mis en jeu est la souche *Flavobacterium arborescens* NRRL B-11 023.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'enzyme mis en jeu consiste en un extrait exempt de cellules du micro-organisme.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'enzyme mis en jeu consiste en matériau cellulaire obtenu à partir dudit micro-organisme.

La présente invention concerne un procédé de transformation du glucose en fructose au moyen d'un enzyme d'isomérisation du glucose. Le procédé selon l'invention est défini à la revendication 1.

Au cours des dernières années s'est développé un intérêt considérable pour la transformation enzymatique du glucose en fructose, en particulier en ce qui concerne la production, à partir d'amidon de maïs, de sirops contenant du fructose. La glucose-isomérase que l'on utilise pour cette transformation peut être obtenue à partir de micro-organismes appartenant à divers genres, comprenant les genres *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus* et *Actinoplanes*. Une autre source de glucose-isomérase a récemment été décrite dans le brevet des E.U.A. N° 3956066 qui décrit la production de glucose-isomérase par des membres de l'espèce *Flavobacterium devorans*.

La présente invention repose sur la découverte que certaines souches de l'espèce *Flavobacterium arborescens* peuvent produire de la glucose-isomérase en quantités significatives. Cet enzyme convient parfaitement pour l'utilisation dans un procédé d'isomérisation du glucose.

Bien que les organismes décrits ici soient identifiés comme des membres de l'espèce *Flavobacterium arborescens*, on notera qu'il y a, à l'heure actuelle, une certaine controverse quant à la classification appropriée de ces organismes. Les pages 362-363 de la 8^e édition du «Manual of Determinative Bacteriology» de Bergey indiquent que l'espèce *F. arborescens* est classée de façon impropre comme un membre de l'espèce *Flavobacterium*. A l'heure actuelle, une nouvelle classification et une nomenclature révisée n'ont pas encore été établies pour ces organismes. On utilise donc ici la nomenclature existante, sachant qu'une autre désignation du genre sera finalement adoptée dans la reclassification de *Flavobacterium arborescens*. On notera également que *Flavobacterium devorans*, auquel on se réfère dans le brevet des E.U.A. N° 3956066, n'est pas sujet à une reclassification et appartient donc en fait à un genre différent.

Les organismes que l'on utilise de préférence pour la production dudit enzyme sont des souches mutantes isolées de la culture ATCC 4358, qui est disponible à l'American Type Culture Collection. Les souches préférées de *F. arborescens* pouvant produire des quantités significatives de glucose-isomérase ont été déposées à la Collection de cultures permanente de Northern Regional Research Laboratory,

1815 North University Street, à Peoria (Illinois, USA) et sont disponibles, depuis le 7 octobre 1976, sous le nom de cultures NRRL B-11 022 et NRRL B-11 023.

Les micro-organismes décrits ici peuvent être cultivés dans divers milieux contenant des sources de carbone et d'azote, et des sels minéraux. Un milieu type comprend de la protéine animale hydrolysée, de la liqueur de macération de maïs, un extrait de levure de brasserie, du phosphate monopotassique, du phosphate dipotassique et un glucide approprié. Les glucides que l'on peut utiliser comprennent le xylose, le glucose, le maltose, le saccharose et le lactose, ainsi que les hydrolysats de xylane, d'amidon et de cellulose. Le pH initial du milieu de culture est d'environ 7 et l'on effectue la fermentation par voie aérobie, à environ 30°C, dans un fermenteur ou une fiole agitée appropriés. On atteint une activité maximale d'isomérase généralement en environ 48 à 72 h.

On titre l'activité d'isomérase produite par les micro-organismes en faisant incuber à 60°C, pendant 30 min, un mélange contenant 0,5 ml de préparation contenant l'enzyme et 1,5 ml d'une solution contenant suffisamment de dextrose, de tampon Tricine (pH 8) et de chlorure de magnésium pour obtenir, respectivement, des concentrations finales 1,0M, 0,1M et 0,03M. A la fin de la période d'incubation, on arrête la réaction d'isomérisation par addition de 0,5 ml d'acide chlorhydrique 1,0N. Après centrifugation, on dilue de façon appropriée la fraction surnageante limpide et on détermine le fructose produit par le mode opératoire de L. Messineo et E. Musarra décrit dans «Int. J. Biochem.» 3(18), 691-699 (1972). L'activité d'isomérase est exprimée en micro-unités, une micro-unité d'activité étant définie comme la quantité d'enzyme qui produira un microgramme de fructose par minute dans les conditions d'analyse décrites précédemment.

On a trouvé que la quantité d'isomérase produite par les souches préférées, dans des conditions de culture favorables, est très substantielle et significativement supérieure aux quantités obtenues avec d'autres micro-organismes producteurs d'isomérase décrits dans la technique antérieure. La production d'isomérase par les souches préférées varie considérablement selon les conditions de culture utilisées. Un résultat particulièrement surprenant et inattendu est que la production maximale d'isomérase se produit quand on utilise du lactose dans le milieu de culture. Par exemple, la culture de NRRL B-11 022, dans un milieu contenant 2% de lactose, donne 2892 micro-unités d'isomérase par millilitre de bouillon de fermentation. Ainsi, les souches préférées se caractérisent, et se distinguent en outre des organismes de la technique antérieure, par le fait qu'elles peuvent produire des quantités substantielles (c'est-à-dire 500 micro-unités par millilitre de bouillon ou plus) d'activité d'isomérase quand on les cultive dans un milieu nutritif contenant du lactose comme seule source de glucide. Une production d'enzyme très substantielle se produit également quand on n'ajoute pas de glucide au milieu. Cela est démontré par les résultats, indiqués dans le tableau 1, obtenus en cultivant à 30°C des souches de *F. arborescens* dans un milieu contenant 1% de protéine animale hydrolysée (Bacto-Tryptone obtenu chez Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), 1% de liqueur de macération de maïs, 1% d'extrait de levure, 1% de phosphate dipotassique, 0,5% de phosphate monopotassique et 2% du glucide quand il est indiqué.

Tableau 1

Production d'isomérase par <i>F. arborescens</i>				
Glucide dans le milieu	Durée (h)	Activité d'isomérase (micro-unités/ml)		
		ATCC 4358	NRRL B-11 022	NRRL B-11 023
Aucun	72	0	1042	1480
Xylose	72	546	892	775
Glucose	72	0	89	1123
Lactose	72	0	2892	1679
Maltose	72	—	1314	—
Saccharose	72	—	1190	—

L'isomérase produite par *F. arborescens* présente une activité utilisable dans un intervalle de pH de 6 à 10, et à une température de 45 à 90°C. Le tableau 2 montre l'effet du pH, et le tableau 3 montre l'effet de la température sur l'activité d'isomérase associée à des cellules entières obtenues en cultivant NRRL B-11 022 dans un milieu nutritif contenant du lactose, à 30°C, pendant 72 h. La stabilité de l'enzyme est indiquée par les résultats du tableau 4. Pour obtenir les résultats des tableaux 2 et 3, on lave une fois avec de l'eau les cellules récoltées et on les remet en suspension dans de l'eau, à la concentration initiale des cellules dans le bouillon de fermentation. On utilise le mode opératoire d'analyse normalisé décrit précédemment pour mesurer l'activité d'isomérase, sauf que l'on fait varier le tampon dans l'étude du pH et que l'on fait varier la température dans les expériences sur l'effet de la température. Les études de stabilité résumées dans le tableau 4 comprennent l'incubation des cellules lavées dans un tampon Tricine 0,05M (pH 8) contenant du chlorure de magnésium (0,004M), et l'analyse des cellules incubées aux intervalles indiqués en utilisant le mode opératoire normalisé d'analyse.

Tableau 2

Effet du pH sur l'isomérase de NRRL B-11 022		
Tampon	pH	Activité d'isomérase (micro-unités/ml)
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

¹ Pipes est l'acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique monosodique.

² Tricine est la N-[2-hydroxy-1,1-bis (hydroxyméthyl)éthyl]-glycine.

Tableau 3

Effet de la température sur l'isomérase de NRRL B-11 022 à pH 8,0	
Température en °C	Activité d'isomérase (micro-unités/ml)
45	775
50	1717
55	2776
60	3500
65	4400
70	5104
75	5960
80	6592
85	7088

Tableau 4

Stabilité de l'isomérase de NRRL B-11 022 à des températures choisies		
Durée totale d'incubation (h)	Activité d'isomérase (micro-unités/ml)	
	Incubation à 60 °C	Incubation à 70 °C
24	2212	2340
96	2276	2244
168	2276	2036
240	2262	2092

On voit d'après les résultats du tableau 4 que l'enzyme est essentiellement stable pendant au moins 200 h à pH 8 et 60°C, comme dé-

terminé en analysant les cellules lavées contenant l'enzyme. La préparation enzymatique de cellules lavées est en outre caractérisée par le fait qu'elle conserve au moins 85% de son activité quand on la chauffe pendant 200 h à 70°C et à pH 8.

L'isomérase produite par *F. arborescens* est très efficace pour transformer le glucose en fructose, et l'on peut mettre en jeu le procédé de l'invention selon divers modes opératoires déjà décrits dans la technique antérieure. Par exemple, on peut utiliser les cellules entières directement dans une opération discontinue dans laquelle la préparation enzymatique comprend le matériau cellulaire provenant du micro-organisme, ou bien les cellules peuvent être immobilisées dans un lit fixe pour une opération continue. Selon une autre variante, on peut utiliser un extrait débarrassé des cellules dans lequel l'isomérase est libérée des cellules par des procédés connus et utilisée sous forme d'enzyme soluble dans un système discontinu, ou est immobilisée pour l'utilisation dans un procédé continu. Des procédés d'utilisation des enzymes sous de telles formes sont bien connus, comme indiqué par exemple par W.R. Vieth et K. Venkatasubramanian, «Chemtech» 3, 677-684 (1973) et 4, 47-55, 309-320 et 434-444 (1974).

Indépendamment de la forme sous laquelle on utilise l'isomérase pour l'isomérisation du glucose, la réaction doit être effectuée à une température comprise entre 45 et 90°C, et de préférence entre 70 et 75°C. Le pH de la solution contenant du glucose doit être maintenu entre 6 et 10, et de préférence entre 6,5 et 8,0, pour minimiser la formation de produits de dégradation à des températures élevées. L'enzyme est efficace avec des solutions de glucose relativement pur, ainsi qu'avec des hydrolysats d'amidon préparés par un traitement acide et/ou enzymatique. On préfère des concentrations en glucose de 30 à 60% en poids. L'activité de l'enzyme est améliorée par addition à la solution contenant le glucose de petites quantités d'ions magnésium. La solution contenant le fructose obtenue par l'isomérisation peut être raffinée en utilisant des procédés classiques, comme un traitement par du charbon activé et des résines échangeuses d'ions.

Les exemples suivants illustreront mieux l'utilisation et les avantages de l'invention. Les sections A, B et C se rapportent à l'obtention de l'enzyme.

A. Dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml, on place 100 ml du milieu nutritif contenant les ingrédients suivants:

	(%)
Protéine animale hydrolysée	1,0
Liqueur de macération de maïs	1,0
Extrait de levure	1,0
K ₂ HPO ₄	0,1
KH ₂ PO ₄	0,5
Lactose	2,0

On inocule le milieu précédent avec un inoculum fraîchement préparé de *F. arborescens* NRRL B-11 022 et on agite le milieu inoculé, à 30°C, en utilisant un agitateur rotatif. Au bout de 72 h, on recueille les cellules et on les lave. Une analyse révèle la présence d'une activité d'isomérase équivalant à 2892 micro-unités/ml de bouillon entier.

Exemple 1:

On effectue l'isomérisation du glucose en fructose en ajoutant 10 g de cellules entières lavées, obtenues par le mode opératoire de la section A, à 500 ml d'un sirop de glucose à 50% (poids/volume) qui est 0,01M en chlorure de magnésium. On ajuste le pH du sirop à 8,0 à l'aide d'hydroxyde de sodium et on fait incuber le sirop à 60°C en agitant doucement. Au bout de 20 h, on analyse la teneur en fructose du sirop et on trouve que 45% du glucose a été transformé en fructose.

B. On répète le mode opératoire de la section A, sauf que l'on utilise du xylose dans le milieu nutritif à la place du lactose et qu'on prépare l'inoculum à partir de *F. arborescens* ATCC 4358. Au bout de 72 h, on récolte les cellules et une analyse indique la présence d'une activité d'isomérase équivalant à 546 micro-unités/ml de bouillon entier.

C. On répète le mode opératoire de la section A, sauf que l'on remplace le lactose par du glucose dans le milieu nutritif et que l'on obtient l'inoculum à partir de *F. arborescens* NRRL B-11 023. Au bout de 64 h, on analyse les cellules recueillies et on trouve qu'elles ont une activité d'isomérase équivalant à 580 micro-unités/ml de bouillon entier.

Exemple 2:

On effectue la transformation enzymatique du glucose en fructose en introduisant 9 g de cellules humides, obtenues par le mode opératoire de la section C, dans 500 ml d'une solution de glucose à 50% (poids/volume) qui est 0,005M en chlorure de magnésium. On ajuste le pH du sirop à 8,0 à l'aide d'hydroxyde de sodium et on fait incuber la solution à 60°C en agitant doucement. L'analyse de la solution après 27 h révèle une teneur en fructose de 38%.

Exemple 3:

On cultive *F. arborescens* NRRL B-11 022 à 30°C pendant 70 h dans un fermenteur New Brunswick de 10 l, en utilisant le milieu nutritif décrit dans la section A. On recueille les cellules et on les immobilise dans le mode opératoire de floculation décrit dans le brevet des E.U.A. N° 3821086, ce qui donne un agrégat de cellules floculées et séchées présentant 75 micro-unités d'activité d'isomérase par gramme. On utilise pour l'isomérisation continue du glucose une colonne de verre de 2,5 cm de diamètre contenant 5 g de l'agrégat séché. On maintient la colonne à 60°C et on fait passer dans la colonne, à un débit de 26 ml/h, une solution de glucose à 50% (poids/volume) qui est 0,005M en chlorure de magnésium et dont le pH a été ajusté à 8,0-8,4. On analyse la teneur en fructose de l'effluent de la colonne et on trouve que le degré de transformation du glucose en fructose est environ 45%.