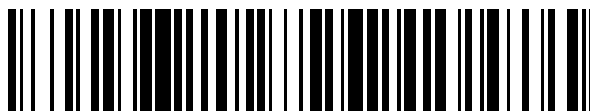


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 163**

51 Int. Cl.:

A23L 29/30 (2006.01)

C12R 1/425 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2013** **PCT/FR2013/051054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013** **WO13171424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013** **E 13727290 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2850213**

54 Título: **Cepa productora de turanosa y sus usos**

30 Prioridad:

16.05.2012 FR 1254484

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.10.2017

73 Titular/es:

ROQUETTE FRÈRES (100.0%)

1 rue de la Haute Loge

62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:

DEFRETIN, SOPHIE y

RAECKELBOOM, DAMIEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 639 163 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa productora de turanosa y sus usos

Descripción

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una cepa productora de turanosa y a sus usos.

Antecedentes tecnológicos de la invención

La turanosa es un isómero de la sacarosa que contiene una unidad de glucosa y una unidad de fructosa unida por una unión $\alpha(1\rightarrow3)$. Es un azúcar típico de la miel, en la cual está presente en pequeña cantidad generalmente comprendida entre 0 y 3%.

- 10 Puede ser producida por ejemplo por hidrólisis parcial de la melecitosa, produciendo de este modo una mezcla equimolar de glucosa y turanosa (CS240545). Además, puede ser producida también por acción de una ciclomaltodextrina glucanotransferasa de *Bacillus stearothermophilus* sobre una mezcla de almidón y de fructosa (JP5252974/93 ; Shibuya et al, 2004, J. Appl. Glycosci., 51, 223-227). El rendimiento no es más que de 45% y el método comprende dos etapas enzimáticas.
- 15 Finalmente, se ha propuesto utilizar una amilosacarasa recombinante procedente de *Neisseria polysaccharea* (NpAS) para convertir la sacarosa en turanosa (Wang et al, 2012, Food Chemistry, 132, 773-779). El rendimiento es de 56% y el método necesita una enzima recombinante.

El experto sabe que la turanosa:

- 20
- tiene un poder endulzante relativamente débil de 0,5 (atribuyéndose el valor 1 a la sacarosa) y una débil cariogenicidad,
 - se puede cristalizar fácilmente,
 - es muy soluble.

Además, la turanosa es un inhibidor de la α -glucosidasa, útil en el diagnóstico de la enfermedad de Pompe.

Presenta asimismo un interés en las áreas alimentarias, cosméticas, farmacéuticas y diagnósticas.

- 25 La turanosa es asimismo una molécula mensajera. Con otras osas, la turanosa también se ha utilizado para imitar las diferentes vías de señalización de la sacarosa en la fotosíntesis.

La turanosa también puede estar implicada en los mecanismos de defensa de las plantas con producción de sustancias defensivas por activación de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos).

- 30 Asimismo, son útiles y se buscan métodos alternativos de producción de turanosa, en particular métodos competitivos a nivel industrial.

Resumen de la invención

Ocupada en poner a punto un procedimiento de producción bastante más eficaz y menos costoso que los descritos en el estado de la técnica, la sociedad Solicitante, en el curso de sus investigaciones, identificó una nueva cepa que presenta la capacidad de producir turanosa.

- 35 **La presente invención se refiere por lo tanto a una cepa bacteriana de *Serratia plymuthica* capaz de producir turanosa. Esta cepa fue depositada el 7 de marzo de 2012 en la CNCM con el número I-4604.**

Asimismo se refiere a una cepa de *Serratia plymuthica* caracterizada por ser capaz de producir turanosa, y que se obtiene a partir de la cepa I-4604 por cultivo, mutagénesis o modificación genética de ésta.

- 40 Preferentemente, la cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención es capaz de producir turanosa con un rendimiento másico de turanosa/sacarosa de al menos 20%, 30%, 40% o 50%.

Se refiere a un método de producción de turanosa que comprende el cultivo de la cepa según la presente invención y la recuperación de la turanosa, y opcionalmente, la purificación de la turanosa.

Preferentemente, la cepa se cultiva a un pH comprendido entre 5,5 y 7, una aireación de 0,5 a 1,5 vvm, en condiciones de agitación comprendidas entre 250 y 700 rpm, y a una temperatura de 25 a 38 °C. De manera

más preferida, la cepa se cultiva a un pH mantenido en 6, a una temperatura de 27 a 30 °C, condiciones de agitación comprendidas entre 250 y 350 rpm, y una aireación de 1 vvm.

Preferentemente, la concentración de partida de sacarosa en el medio de producción está comprendida entre 100 y 300 g/L, preferentemente es de 200 g/L.

- 5 En un modo de realización particular, el medio de producción contiene de 2 a 6 g/L de extracto de levadura o de 10 a 30 g/L de licor de maíz macerado (como SOLULYS® 048E comercializado por la sociedad Solicitante), preferentemente aproximadamente 4 g/L de extracto de levadura. Preferentemente, la purificación de la turanosa comprende una etapa de centrifugación del mosto de fermentación, etapas de tratamiento con negro de carbón en polvo y de filtración del sobrenadante, una etapa de desmineralización, 10 una etapa de ultrafiltración con un umbral de corte a 1 kD, y luego una etapa de cristalización del filtrado.

La presente solicitud describe una composición rica en turanosa capaz de ser obtenida u obtenida por el procedimiento según la presente invención. Preferentemente, contiene al menos 80% de turanosa en peso total de DP2, 0,01 a 10% de trehalulosa en peso total de DP2 y 0,01 a 5% de isomaltulosa en peso total de DP2.

- 15 La presente solicitud describe un método de preparación de una composición alimenticia que comprende proporcionar turanosa obtenida por el método según la presente invención e incorporar la turanosa obtenida en la composición alimenticia. Asimismo se refiere a un método de preparación de una composición alimenticia que comprende proporcionar una composición rica en turanosa obtenida por el método según la presente invención e incorporar la composición obtenida en la composición alimenticia.
- 20 Por último, la presente solicitud describe un método de preparación de una composición rica en turanosa capaz de ser obtenida u obtenida por el procedimiento según la presente invención destinada a las áreas alimentarias, cosméticas, farmacéuticas, diagnósticas y fitosanitarias.

Descripción detallada de la invención

- 25 De manera totalmente sorprendente, la Solicitante ha logrado identificar y aislar una cepa capaz de producir turanosa de manera eficaz entre un muy gran número de microorganismos procedentes de una campaña de obtención de muestras de tierra.

La cepa identificada es una bacteria *Serratia plymuthica* denominada en este documento I-4604. Fue depositada el 7 de marzo de 2012 en la CNCM con el número I-4604. Esta cepa podrá ser designada « I-4604 » posteriormente en la presente solicitud.

- 30 Esta cepa presenta la interesante propiedad de producir turanosa en gran cantidad. En efecto, permite la obtención de turanosa con un rendimiento másico de turanosa/sacarosa de más de 35%. Más precisamente, se ha observado un rendimiento promedio turanosa/sacarosa de aproximadamente 38% cuando se ha utilizado una base de melaza. Este rendimiento aumenta a más de 50% cuando se usa una base de sacarosa.

- 35 Esta cepa es totalmente original en cuanto a su capacidad de producir turanosa. En efecto, los inventores probaron también tres cepas del mismo género, a saber *Serratia plymuthica* ATCC 15928, *Serratia ficaria* GRIMONT 4024 y *Serratia ficaria* DSM 4569. Ninguna de las cepas probadas a título comparativo ha mostrado la menor capacidad de producir turanosa.

- 40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a la cepa I-4604 y a una bacteria derivada de esta cepa, por ejemplo por cultivo, ingeniería genética o mutagénesis de ésta, que conserva la propiedad de producir turanosa. La mutagénesis puede ser dirigida y/o aleatoria. En particular, las cepas de *Serratia plymuthica* según la presente invención presentan la capacidad de producir turanosa con un rendimiento másico de turanosa/sacarosa de al menos 20%, 30%, 40% o 50%. Preferentemente, el rendimiento es de al menos 30%.

- 45 La presente invención se refiere a una composición que contiene una cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604, y opcionalmente un medio de cultivo. Preferentemente, el medio de cultivo es adecuado para la producción de turanosa por la cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604. Principalmente, ese medio contiene sacarosa. Idealmente, contiene aproximadamente 100 a 300 g/L, aproximadamente 100 a 200 g/L o aproximadamente 200 g/L de 50 sacarosa. Más precisamente, el medio de cultivo puede contener sacarosa así como extracto de levadura y/o licor de maíz macerado (como SOLULYS® 048E comercializado por la sociedad Solicitante).

Se entiende en el presente documento que el término «aproximadamente» significa más o menos 10%, preferentemente más o menos 5%. Por ejemplo, para un valor de 100, «aproximadamente 100» significa entre 90 y 110, preferentemente entre 95 y 105.

La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604, en una reacción de fermentación. En particular, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604, para la producción de turanosa.

- 5 Se refiere además a un método de producción de turanosa, que comprende el cultivo de la cepa según la presente invención y la recuperación de la turanosa, y opcionalmente, la purificación de la turanosa. En particular, el cultivo de la cepa se lleva a cabo en presencia de sacarosa en condiciones de fermentación adaptadas a la producción de turanosa.

10 Preferentemente, la cepa ha sido sometida, antes de la etapa de producción o fermentación, a una etapa de precultivo o de subcultivo. Los medios de precultivo y de subcultivo contienen sacarosa, por ejemplo aproximadamente 50 a 150 g/L de sacarosa, preferentemente aproximadamente 100 g/L. Esos medios contienen además otros nutrientes. Particularmente, pueden contener extractos de levadura y/o licores de maíz macerado (como SOLULYS® 048E comercializado por la sociedad Solicitante).

15 Por ejemplo, pueden contener 5-15 g/L de extracto de levadura y/o 5 a 30 g/L de SOLULYS® 048E. Particularmente, pueden contener ya sea aproximadamente 10-15 g/L de extracto de levadura, aproximadamente 10-15 g/L de extracto de levadura y aproximadamente 5 g/L de SOLULYS® 048E o aproximadamente 30 g/L de SOLULYS® 048E. En un modo de realización preferido, contienen aproximadamente 10-15 g/L de extracto de levadura. Las etapas de precultivo y de subcultivo se realizan a una temperatura de 25 a 38 °C, preferentemente de 27 a 30°C, y en particular a aproximadamente 30 °C. La
20 etapa de precultivo puede durar de 10 a 30 h, preferentemente de aproximadamente 15 a 25 h. La etapa de subcultivo puede durar de 5 a 25 h, preferentemente de aproximadamente 10 a 20 h. El pH de partida puede estar comprendido entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7. En un modo de realización preferido el pH de partida es de aproximadamente 7. La agitación puede estar comprendida entre aproximadamente 100 y 200 rpm (revoluciones por minuto). Preferentemente, es de aproximadamente 150 a 170 rpm.

25 Preferentemente, la sacarosa está presente en el medio de producción en una concentración inicial comprendida entre aproximadamente 100 y aproximadamente 300 g/L. Preferentemente, está presente en una concentración inicial de aproximadamente 100 a 200 g/L. En un modo de realización preferido, está presente a una concentración inicial de aproximadamente 200 g/L. La sacarosa puede ser añadida en forma purificada o en forma de melaza. Puede ser añadida al medio de cultivo al comienzo de la producción o de la
30 fermentación, varias veces en el curso de la producción o la fermentación o de manera continua durante la producción o fermentación. En un modo de realización preferido, se añade el medio de cultivo al principio de la producción o la fermentación.

35 Con respecto a las condiciones de pH, se ha determinado, en el momento de la optimización de la producción de turanosa, que el pH podía estar comprendido entre aproximadamente 5,5 y 7, preferentemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, de manera aún más preferida a aproximadamente 6. Preferentemente, el pH se mantiene durante la etapa de producción. En un modo de realización, el pH se mantiene a aproximadamente pH 6 durante la etapa de producción.

40 Con respecto a las condiciones de agitación, el cultivo se lleva a cabo en agitación, en particular en agitación entre aproximadamente 250 y aproximadamente 700 rpm, preferentemente entre 300 y 500 rpm. La agitación se puede realizar con ayuda de una barra magnética u otro medio conocido por el experto. En un modo de realización, el cultivo se realiza en agitación a aproximadamente 300 rpm.

Con respecto a las condiciones de aireación, el cultivo se realiza con una aireación de 0,5 a 1,5 vvm (volumen de aire por minuto y por volumen). En un modo de realización, el cultivo se realiza con una aireación de aproximadamente 1 vvm.

45 Con respecto a las condiciones de temperatura, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 25 y aproximadamente 38 °C. En un modo de realización, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 27 y 30 °C.

En un modo de realización particular, el medio de producción contiene de 2 a 6 g/L de extracto de levadura o de 10 a 30 g/L de SOLULYS® 048E, preferentemente aproximadamente 4 g/L de extracto de levadura.

50 La duración del cultivo puede ser determinada por una duración máxima condicionada por el consumo total de sacarosa. Preferentemente, el cultivo de producción dura al menos 20 h, habitualmente más de 30 h. En un modo de realización preferido, el cultivo de producción dura entre 30 y 50 h, preferentemente aproximadamente 40 h.

55 Preferentemente, la etapa de producción se lleva a cabo respetando una o varias condiciones de fermentación como las detalladas precedentemente. Preferentemente, se respetan todas las condiciones.

Después de la etapa de fermentación, la biomasa puede ser recuperada del medio de fermentación por cualquier método conocido por el experto, por ejemplo la biomasa puede ser extraída del fermentador y simplemente concentrada por microfiltración o centrifugación, o lavada por sucesión de concentraciones-diluciones con una solución acuosa.

Después de la etapa de recolección de la turanosa, el método puede comprender una etapa de purificación de la turanosa. Esta etapa de purificación puede comprender una etapa de centrifugación del mosto de fermentación, recuperándose el sobrenadante. Ese sobrenadante puede ser objeto de etapas complementarias de purificación. Esas etapas de purificación se pueden elegir entre etapas de tratamiento con negro de carbón, etapas de filtración, etapas de ultrafiltración, etapas de desmineralización, etapas de cristalización y combinaciones de éstas. En un modo de realización particular, la purificación comprende una etapa de tratamiento con negro de carbón, una etapa de filtración, una etapa de desmineralización, una etapa de ultrafiltración con un umbral de corte de 1 kD y una etapa de cristalización. En un modo de realización preferido, comprende esas etapas en el orden de aparición en la lista.

La presente solicitud describe una turanosa originada por fermentación capaz de ser obtenida u obtenida por fermentación de la cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604. Por lo tanto, se refiere a la turanosa capaz de ser obtenida u obtenida por el método de producción según la presente invención.

La presente solicitud describe una composición rica en turanosa capaz de ser obtenida u obtenida por fermentación de la cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604, o dicho de otra manera por el método de producción según la presente invención. Esta composición contiene al menos 80% de turanosa en peso total de DP2, preferentemente al menos 85%, 90% o 95%. Por DP2 se entiende «disacáridos». La composición puede contener además trehalulosa y/o isomaltulosa. La trehalulosa está preferentemente presente en la composición en proporciones comprendidas entre 0,01 y 10% en peso total de DP2. La isomaltulosa está preferentemente presente en la composición en proporciones comprendidas entre 0,01 y 5% en peso total de DP2. Preferentemente, la composición contiene trehalulosa e isomaltulosa. También pueden estar presentes otras impurezas como ácido glicérico glucosilado, fructosa, ácido 2-cetoglutarico, ácido cítrico, ácido succínico y/o ácido láctico glucosilado.

La turanosa es particularmente útil en la industria alimentaria. Principalmente, se puede incorporar en bebidas, confituras, barras de cereales, productos achocolatados, etc. Por consiguiente, la solicitud describe una composición alimenticia que contiene una composición rica en turanosa capaz de ser obtenida u obtenida por fermentación de la cepa de *Serratia plymuthica* según la presente invención, en particular la cepa I-4604.

Por último, la presente solicitud describe un método de preparación de una composición alimenticia que comprende proporcionar turanosa obtenida por el método según la presente invención e incorporar la turanosa obtenida en la composición alimenticia. Preferentemente, la composición alimenticia es una bebida, una confitura, una barra de cereales o un producto achocolatado.

Esta composición puede asimismo aprovecharse en el las áreas alimentarias, cosméticas, farmacéuticas, diagnósticas y fitosanitarias.

La invención se comprenderá mejor con ayuda de los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Producción de turanosa a partir de sacarosa por la cepa I-4604 y comparación con cepas del mismo género y la misma especie

La fermentación de turanosa a partir de sacarosa se probó con la cepa identificada en la presente invención I-4604 y con otras cepas del mismo género y de la misma especie, particularmente las cepas siguientes:

Serratia plymuthica ATCC 15928

Serratia ficaria GRIMONT 4024

Serratia ficaria DSM 4569

1- Resultados

1.1- Fermentaciones realizadas con la cepa I-4604

	[Sacarosa] _c g.L ⁻¹	[Turanosa] _p g.L ⁻¹	[Isomaltulosa] _p g.L ⁻¹	Y _{Tur/Sac} %	Productividad g.L ⁻¹ h ⁻¹
Base de melaza	120,2	53,1	ND	37,69	1,36
	123	54,9	ND	38,19	1,41
Base de sacarosa	187,4	103,4	ND	46,37	2,66
	185,4	98,5	ND	44,91	2,53
	134,7	68,5	8	50,12	1,77
	194,2	94,8	4,2	48,16	2,45
	194,6	99,6	5,1	50,11	2,55
Base de sacarosa pH no regulado el comienzo de la fermentación	182,5	103,8	5	52,44	2,66
c = consumida; p = producida					

El rendimiento másico promedio basado en las dos fermentaciones con base de melaza de remolacha es de $37,9 \pm 0,2$ %. Su productividad es de $1,4 \pm 0,05$ g/L/h.

5 Los comportamientos obtenidos basados en las tres mejores fermentaciones con base de sacarosa (en negrilla en la tabla 1) son los siguientes:

- Rendimiento másico: $48,2 \pm 1,5$ %
- Título en turanosa: $99,3 \pm 3,5$ g/L (para una base con 200 g/L de sacarosa)
- Productividad: $2,55 \pm 0,1$ g/L/h

10 En 39 h de fermentación, toda la sacarosa se consumió. Se constató en el momento de los análisis que la cepa I-4604 no produce ácido glucónico.

Parecería que los rendimientos másicos son muy importantes, cuando la cepa I-4604 se cultiva en las condiciones en las que el pH no se regula al comienzo (el pH disminuye a 5 luego de 14 h de fermentación).

1.2- Fermentaciones realizadas con la cepa de referencia ATCC 15928

	[Sacarosa] _c g.L ⁻¹	[Turanosa] _p g.L ⁻¹	[Isomaltulosa] _p g.L ⁻¹	Y _{Isom/Sac} %	Productividad g.L ⁻¹ h ⁻¹
Base de sacarosa	117,1	0	95	76,58	2,46
	209,8	0	138,7	63,46	3,59
	186,4	0	126,4	69,81	3,24
c = consumida; p = producida					

En las mismas condiciones que la I-4604, esta cepa no produce nada de turanosa. En revancha, como se indica en la bibliografía, produce isomaltulosa y un poco de trehalulosa (Kawaguti, et al, Food chemistry, 2010 120, no.3).

1.3- Fermentaciones realizadas con las otras cepas de *Serratia ficaria* probadas GRIMONT 4024 y DSM 4569

Estas cepas mostraron un crecimiento similar al de *S. plymuthica*, pero no produjeron turanosa ni isomaltulosa.

2- Conclusiones

Las cepas se probaron por triplicado en las mismas condiciones de fermentación. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Rendimiento másico de turanosa/sacarosa	Roquette I-4604	46,37 %	48,16 %	50,11 %
	ATCC15928	0%	0%	0%
	Grimont 4024	0%	0%	0%
	DSM 4569	0%	0%	0%

La cepa I-4604 se comparó con varias cepas de *Serratia*, todas probadas en las mismas condiciones de producción sobre sustrato sacarosa. Sólo la cepa I-4604 produce turanosa.

3- Materiales y métodos

Modo operativo

La preparación de las muestras comprendió tres etapas: una etapa de revivificación, una etapa de precultivo y una etapa de subcultivo. La revivificación comprendió tres repiques sucesivos de la cepa sobre medio geloso. El precultivo se efectuó durante 16 h a 160 rpm y 30 °C en el medio de precultivo. El subcultivo se efectuó durante 9 h a 160 rpm y 30 °C en el medio de subcultivo.

En seguida, se efectuó una etapa de fermentación en biorreactores DASGIP con un volumen de partida de 1500 mL. La fermentación duró 39 h a 300 rpm, a 1 vvm (volumen de aire por minuto y por volumen) (90 L/h) manteniendo el pH a 6 con soda 5 N.

Composición de los medios

Medio geloso

Sacarosa:	40 g/L
SOLULYS® 048E:	20 g/L
Peptona (Becton Dickinson):	10 g/L
Agar (Biokar Diagnostics):	20 g/L
Agua osmosificada:	csp 1000 mL

pH rectificado a 7 con NaOH

Esterilización 20 min a 120 °C

Medio de precultivo

Sacarosa:	100 g/L
-----------	---------

Esterilización por filtración en	0,22 µm
Extracto de levadura:	9,7 g/L

pH rectificado a 7,0 (con NaOH)/esterilización 20 min a 120 °C

1 gota de antiespumante

Inóculo: 1 ansada de 10 µl a partir del 3er repique

Medio de subcultivo

5 Igual que el medio de precultivo

Inóculo: 10% del precultivo (15 ml)

Medio de producción

1- Base de sacarosa

Sacarosa	200 g/L
Esterilización por filtración en	0,22 µm
Extracto de levadura:	4,2 g/L
pH rectificado a 7,0 (con NaOH)/esterilización 20 min a 120 °C	10 gotas de antiespumante

10 2- Base de melaza de remolacha (a 84,1% de DP2)

Melaza de remolacha	357 g
Esterilización por filtración en	0,22 µm
Extracto de levadura:	4,2 g/L
pH rectificado a 7,0 (con NaOH)/esterilización 20 min a 120 °C	10 gotas anti-mousse

Inóculo: 6% del subcultivo (90 ml)

Ejemplo 2 -Optimización de las condiciones de producción de turanosa con base de sacarosa con la cepa I-4604

15 Se probaron separadamente muchas condiciones de agitación, de aireación y de pH en la etapa de producción. Los medios de precultivo, subcultivo y producción fueron los mismos que en el ejemplo 1. Las optimizaciones se hicieron en fermentador de 2 L.

Efecto de la agitación

20 La agitación se probó a 300, 500 y 700 rpm, siendo los otros parámetros 30 °C, 1 vvm y un pH regulado a 6. Los resultados fueron los siguientes.

300 rpm

Tiempo (h)	0	15	22,5	39,5
Sacarosa (g/l)	198,1	74,2	33,9	2,3

Turanosa (g/l)	3	76	98,3	113,8
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	8,26	5,37	1,86
Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,87	2,97	0,91
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	58,04	-

500 rpm

Tiempo (h)	0	15	22,5	39,5
Sacarosa (g/l)	193,2	68,5	32,1	4,7
Turanosa (g/l)	2,8	70,8	90,7	103,1
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	8,31	4,85	1,61
Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,53	2,65	0,73
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	54,56	-

700 rpm

Tiempo (h)	0	15	22,5	39,5
Sacarosa (g/l)	202,2	67,3	31,9	4,6
Turanosa (g/l)	2,8	72,8	93,1	107,7
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	8,99	4,72	1,61
Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,67	2,71	0,86
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	53,02	-

5

Efecto de la aireación

La aireación se probó a 0,5, y 1,5 vvm, siendo los otros parámetros 30 °C, 300 rpm y un pH regulado a 6. Los resultados fueron los siguientes.

0,5 vvm

Tiempo (h)	0	14,25	22,75
Sacarosa (g/l)	196,2	64,1	19,7
Turanosa (g/l)	3,3	74,4	100
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	9,27	5,22

ES 2 639 163 T3

Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,99	3,01
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	54,79

1 vvm

Tiempo (h)	0	14,25	22,75
Sacarosa (g/l)	189,6	74,3	26,8
Turanosa (g/l)	2,9	71,3	98,9
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	8,09	5,59
Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,80	3,25
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	58,97

1.5 vvm

Tiempo (h)	0	14,25	22,75
Sacarosa (g/l)	201,6	74,7	26,3
Turanosa (g/l)	3,5	76,3	104,4
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	8,91	5,69
Producción de turanosa (g/l/h)	-	5,11	3,31
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	57,56

Efecto del pH

El pH se probó a 5,5, 6 y 6,5, siendo los otros parámetros 30 °C, 300 rpm y 1 vvm. Los resultados obtenidos fueran los siguientes:

pH regulado a 5,5

Tiempo (h)	0	15	23
Sacarosa (g/l)	194,3	74,7	32,8
Turanosa (g/l)	3,7	69,4	89,9
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	7,97	5,24
Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,38	2,56
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	53,37

pH regulado a 6

Tiempo (h)	0	15	23
Sacarosa (g/l)	198,1	62,2	24,3
Turanosa (g/l)	3,4	82,5	105
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	9,06	4,74
Producción de turanosa (g/l/h)	-	5,27	2,81
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	58,46

pH regulado a 6,5

Tiempo (h)	0	15	23
Sacarosa (g/l)	197,9	64,2	27,2
Turanosa (g/l)	3,5	77,1	99,7
Consumo de sacarosa (g/l/h)	-	8,91	4,63
Producción de turanosa (g/l/h)	-	4,91	2,83
Rendimiento de turanosa (%)	-	-	56,36

- 5 Las condiciones más adecuadas se definieron como una agitación de 300 rpm, una aireación de 1 vvm y un pH regulado a 6,0.

Además, la cantidad de sacarosa utilizada en la etapa de fermentación así como el medio cultivo utilizado fueron objeto de optimización.

Efecto de la concentración de partida de sacarosa

- 10 Se probaron dos concentraciones de partida, a saber 100 y 200 g/L de sacarosa.

Se realizó un precultivo a 30 °C, 160 rpm, durante 23 h 30 en un medio de pH 7 que contenía 30 g/L de sacarosa y 30 g/L de SOLULYS® 048E esterilizado por separado 20 min a 120 °C y 1 gota de antiespumante. La producción se realizó a 30°C, 300 rpm, 1 vvm durante 25 h en un medio de pH 7 que contenía 100 o 200 g/L de sacarosa y 30 g/L de SOLULYS® 048E esterilizado por separado 20 min a 120 °C y 10 gotas de antiespumante. El pH se elevó a 5,8 a las 6 h de fermentación y se reguló a 5,5 a partir de las 9 h.

- 15 y 10 gotas de antiespumante. El pH se elevó a 5,8 a las 6 h de fermentación y se reguló a 5,5 a partir de las 9 h.

100 g/L de sacarosa de partida

Tiempo (h)	0	6	9	25
Sacarosa (g/l)	101,6	45,3	16,9	<0,5
Turanosa (g/l)	2,1	28,1	40,7	35,1

200 g/L de sacarosa de partida

Tiempo (h)	0	6	9	25
Sacarosa (g/l)	190,3	150,6	117,7	11
Turanosa (g/l)	1,9	26,2	44,8	92,9

La concentración de partida de sacarosa de 200 g/L da mejores resultados.

Estudio del medio

Se evaluaron tres grupos de medios de cultivo.

	Precultivo	Subcultivo	Producción
Medio 1	Sacarosa 100 g/L	Sacarosa 100 g/L	Sacarosa 200 g/L
	Extracto de levadura 14 g/L	Extracto de levadura 10 g/L	NH ₄ H ₂ PO ₄ 1,3 g/L
	SOLULYS® 048E. 5 g/L	SOLULYS® 048E. 5 g/L	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1,3 g/L
			MgSO ₄ , 7H ₂ O 0,4 g/L
			Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 0, g/L
Medio 2	Sacarosa 100 g/L	Sacarosa 100 g/L	Sacarosa 200 g/L
	Extracto de levadura 9,7 g/L	Extracto de levadura 9,7 g/L	Extracto de levadura 4,2 g/L
Medio 3	Sacarosa 100 g/L	Sacarosa 100 g/L	Sacarosa 200 g/L
	SOLULYS® 048E 30 g/L	SOLULYS® 048E 30 g/L	SOLULYS® 048E 13 g/L
Condiciones	30 °C, 165 rpm, 18 h	30 °C, 165 rpm, 9 h	30 °C, 300 rpm, pH 6

Los resultados obtenidos son los siguientes.

	Tiempo (h)	0	15	20,5	24	39,5
Medio 1 (g/L)	sacarosa	204	75,8	45,3	28,8	1,1
	turanosa	-	70,6	88,5	102,6	111,8
Medio 2 (g/L)	sacarosa	204,8	66,8	37,7	22,7	1
	turanosa	-	78,8	96,9	104,8	114,5
Medio 3 (g/L)	sacarosa	193,8	94,2	58,9	44,7	7,8
	turanosa	-	65,8	79	90,9	113,2

El medio 2 parece más apropiado porque permite ganar tiempo.

Ejemplo 3 -Producción de turanosa con ayuda de la cepa I-4604

Se realizó la producción de turanosa con ayuda de la cepa I-4604 en fermentadores de 20 L.

- 5 La fermentación se efectuó a partir de sacarosa y de melaza. El protocolo fue el siguiente.

Precultivo

Sacarosa	100 g/L
SOLULYS® 048E	15 g/L
Erol 18	1 gota

Se esterilizó la totalidad a 120 °C durante 20 min y se ajustó a pH 7.

El precultivo se realizó en 3 Enlenmeyers de 500 mL durante 24 h a 30 °C y 120 rpm.

- 10 Subcultivo

Sacarosa	100 g/L
SOLULYS® 048E	30 g/L
Erol 18	0,5 ml/L

Se esterilizó la totalidad a 120 °C durante 20 min y se ajustó a pH 7.

El subcultivo se realizó en un fermentador en un volumen de 15 L durante 19 h, a 30 °C, 300 rpm y 1 vvm.

Producción

Sacarosa	100 g/L) esterilizada a 120 °C durante 10 min
Erol 18	0,5 ml/L) idem
SOLULYS® 048E	30 g/L) esterilizado a 120 °C durante 20 min

- 15 El pH se ajustó a pH 6. El cultivo se llevo a cabo en un fermentador en un volumen de 15 L a 30 °C, 300 rpm y 1 vvm.

Resultados

Tiempo (h) (g/L)	14	22	30	36	47
Sacarosa	45,9	11,7	1,3	0	0
Glucosa	0	0	0	0	0
Fructosa	17,1	18,3	14,5	7,3	0
Isomaltulosa	4,1	4,5	4,8	4,9	4,8
Trehalulosa	9,5	10,7	11,1	11,8	11,1
Turanosa	93,9	97,3	97,7	102,1	102,8
Riqueza	75,3	74,4	76,3	80,9	86,6
Rendimiento (%)	60,9	51,7	49,1	51,05	51,4

Los resultados promedio de 4 ensayos son los siguientes:

- Rendimiento (turanosa/sacarosa): 53%
- Duración: 45 a 50 h
- Composición final en azúcares:
 - Turanosa: 106 g/L (86% de los azúcares)
 - Trehalulosa: 12 g/L
 - Isomaltulosa: 5 g/L

- 5
- 10 El medio de cultivo propuesto inicialmente es simple y poco oneroso, los efectos de la temperatura, del pH, del nivel de oxigenación y del modo de aporte de la sacarosa se estudiaron a continuación.

La tabla siguiente recapitula los resultados del conjunto de ensayos efectuados:

Composición final (g/l)									
Condiciones	Duración	Abs 620 nm	fructosa	isomaltulosa	trehalulosa	turanosa	ác. 2-ceto	Riqueza / DP2 (%)	Rendimiento / sacarosa (%)
ESTÁNDAR	47h	20	0	5	12	106		86,0	53,0
sacarosa 100g/l	15h	21,65	0	2,8	4,7	53,4		87,7	53,4
sacarosa FB 100g/l	15h	21,4	0,7	1,9	3,8	35,2		86,1	35,9
27°C - 2 x 100g/l	56h	22,21	0	4,4	9,8	99,6		87,5	49,8
500RPM	40h	22,17	27,1	5,3	13,5	111,4	6,6	85,6	56,0
400RPM	36h	17,56	26,3	5,4	12,2	105,9	7,5	85,7	53,5
33°C	30h	16,78	21	5,4	12,4	97,2		84,5	48,6
36°C	41h	16,16	28,1	6,3	14,9	96,9		82,0	48,5
27°C	47h	18,97	0	4,6	10,5	105		87,4	52,5
pH 5,0	21h	2,04	paso de crecimiento						
pH 7,0	41h	15,6	25,4	4,5	12,8	92,8		84,3	46,4

Ninguna modificación tuvo un efecto significativamente positivo pero sin embargo se pueden extraer las conclusiones siguientes:

- el pH se debe mantener a 6,0;
- la temperatura se debe mantener por debajo de 30 °C. La óptima parece ser cercana a los 27 °C.
- 5 • un nivel de oxigenación muy importante (agitación de 400 o 500 rpm) enlentece el consumo de sacarosa y causa una fuerte producción de ácido 2-cetoglucónico.
- la adición de una segunda etapa de precultivo no aporta ninguna ventaja.
- no resulta interesante aportar sacarosa progresivamente (FB = fed-batch, alimentación semidiscontinua).

10 **Ejemplo 4 -Purificación de turanosa a partir de mosto de fermentación de la cepa I-4604**

1- Las etapas de purificación del mosto de fermentación

La separación de la biomasa se efectuó por centrifugación a 12 000 g. El sobrenadante estaba todavía turbio. Para quitar esa turbidez, se efectuaron un tratamiento con negro de carbón en polvo (1% de SX+) y una filtración en placa Cofram EKS. El filtrado obtenido estaba más límpido pero no decolorado.

- 15 La desmineralización se realizó en catión fuerte (C150) y anión débil (4228). La carga del producto antes de la desmineralización era de 170 meq/l. La resistividad del producto purificado fue inferior a 5 kOhm porque contenía muchos ácidos orgánicos. La composición en ácidos orgánicos se indica en las tablas siguientes.

Para mejorar la riqueza antes de la cristalización, se realizó una ultrafiltración por encima de 1 kD. Esta etapa permitió retener la coloración y los productos de pesos moleculares superiores a 1 kD.

20 **2- Cristalización**

La cristalización se realizó a temperatura ambiente, después de haber llevado a ebullición una mezcla de 100 g del producto de 70 bx y 200 mL de etanol 96%. La separación de los cristales y de las aguas madres se efectuó en un embudo Büchner dada la débil viscosidad de la mezcla. En esas condiciones, para 2 litros de fermentador utilizados, se recuperaron 70 g de cristales (riqueza en turanosa 98-99%), o sea un
25 rendimiento másico de 30%.

Los cristales presentaron una buena riqueza, como ilustran las tablas siguientes.

Resultados en g/L	
Turanosa	115,6
Trehalulosa	14
Isomaltulosa	6,3
Ác. glicérico glucosilado	~5
Fructosa	2,8
Ác. 2-cetoglutarico	~2
Ác. cítrico	~2
Ác. succínico	~1
Ác. láctico glucosilado	~3
Resultados en %/bruto	
Materia seca	99,8
Fructosa	<0,05
Glucosa	<0,05
Ác. láctico glucosilado	<0,05
Palatinosa	1,1
trehalulosa	0,2
Otros DP2	0,3

Esas diferentes etapas de purificación permitieron obtener una buena riqueza en turanosa.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Serratia plymuthica* depositada el 7 de marzo de 2012 en la CNCM con el número I-4604.
2. Una cepa de *Serratia plymuthica* caracterizada por ser capaz de producir turanosa, y que se obtiene a partir de la cepa según la reivindicación 1 por cultivo, mutagénesis o modificación genética de ésta.
- 5 3. La cepa según una de las reivindicaciones 1 o 2, que se caracteriza por ser capaz de producir turanosa con un rendimiento másico de turanosa/sacarosa de al menos 20%, 30%, 40% o 50%.
4. El uso de la cepa según una de las reivindicaciones 1 a 3 para producir turanosa.
5. El método de producción de turanosa que comprende un cultivo de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y la recuperación de la turanosa, y opcionalmente, la purificación de la turanosa.
- 10 6. El método según la reivindicación 5, que se caracteriza porque la cepa se cultiva a un pH comprendido entre 5,5 y 7, con una aireación de 0,5 a 1,5 vvm, en condiciones de agitación comprendidas entre 250 y 700 rpm, y a una temperatura de 25 a 38 °C.
7. El método según la reivindicación 5 o 6, que se caracteriza porque la cepa se cultiva a un pH mantenido en 6, una temperatura de 27 a 30 °C, en condiciones de agitación comprendidas entre 250 y 350 rpm, y con una aireación de 1 vvm.
- 15 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la concentración de partida de sacarosa en el medio de producción está comprendida entre 100 y 300 g/L, preferentemente es de 200 g/L.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el medio de producción contiene de 2 a 6 g/L de extracto de levadura o de 10 a 30 g/L de SOLULYS® 048E, preferentemente aproximadamente 4 g/L de extracto de levadura.
- 20 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la purificación de turanosa comprende una etapa de centrifugación del mosto de fermentación, etapas de tratamiento con negro de carbón en polvo y de filtración del sobrenadante, una etapa de desmineralización, una etapa de ultrafiltración con un umbral de corte a 1 kD, y luego una etapa de cristalización del filtrado.