



423247

F.E. 24-10-75

Int. Cl.:	C13K

PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita, a favor de la firma BAX-
 TER LABORATORIES, INC., de nacionalidad estadounidense,
 con domicilio en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos),
 y que ha de recaer sobre "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL PRO-
 CEDIMIENTO DE TRANSFORMACION DE D-GLUCOSA EN D-FRUCTOSA
 POR MEDIO DE UNA ENZIMA DE ISOMERASA DE GLUCOSA".

Memoria Descriptiva

10 El registro de patente de invención que se solici
 ta tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva
 en todo el territorio nacional y sus posesiones de unas
 mejoras introducidas en el procedimiento de transformación
 de D-glucosa en D-fructosa por medio de una enzima de iso
 15 merasa de glucosa, conforme se describe a continuación.



Extracto de la Descripción

En la transformación se utiliza como enzima catalizadora isomerasa de glucosa inmovilizada, que se prepara haciendo reaccionar células microbianas completas que
5 contienen isomerasa de glucosa con un compuesto diamino aromático diazotizado primario.

Descripción General del Invento

El invento se refiere a una enzima de isomerasa de glucosa y, más particularmente, a la preparación, con
10 células completas inmovilizadas, de isomerasa de glucosa.

La isomerasa de glucosa es una enzima o una preparación de enzimas que cataliza la transformación de la D-glucosa en D-fructosa. Los compuestos de glucosa y de fructosa que entran en juego en esta reacción de transformación están íntimamente relacionadas con los monosacáridos,
15 teniendo la glucosa una estructura de hexona y teniendo la fructosa la forma de heptohexosa. Estos azúcares sencillos se presentan naturalmente y se encuentran tanto en estado libre como en forma aglomerada en plantas y animales. Encuentran una amplia utilización como endulzadores en confitados, preparaciones culinarias y otros productos alimenticios.
20

Comercialmente, la mayor parte de la glucosa se fabrica mediante hidrólisis de almidón de maíz. Aunque la fructosa pueda ser preparada partiendo de sucrosa mediante transformación enzimática, es más interesante desde el punto de vista económico producir fructosa a partir de la glucosa. En la producción de ciertos productos de inversión tal como dextrosa de maíz, se transforma normalmente en fructosa una parte de la glucosa. La importancia de esta trans
25
30



formación de la glucosa en fructosa en la fabricación de la dextrosa de maiz consiste en el hecho de que la fructosa no solamente es más dulce que la glucosa sino que también es muy higroscópica y cristaliza más difícilmente. Por tanto, un procedimiento adecuado para incrementar el rendimiento de transformación de la glucosa en fructosa encontraría una utilización amplia en la práctica comercial para la fabricación de dextrosa de maiz.

Se ha informado que la isomerasa de glucosa de enzimas puede ser fabricada por numerosos microorganismos. Algunos de estos microorganismos son, por ejemplo, Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Bacillus coagulans, B. megaterium, Brevibacterium pentoamino-acidicum, Escherichia intermedia, Lactobacillus brevis, L. fermenti, L. gayonii, L. lycopersici, L. mannitopoeus, L. pentoaceticus, Leuconostoc mesenteroides, Paracolobactrum aerogenoides, Pseudomonas hydrophilia, Streptomyces achromogenus, S. albus, S. bobilliae, S. echinatur, S. flavovirens, S. olivaceus, S. olivochromogenes, S. phaeochromógenes, S. rubiginosus, S. venezualae, y S. wedmorensis.

La isomerasa de glucosa es esencialmente una enzima intracelular. Es decir que esta enzima se encuentra principalmente en las células de los microorganismos o adherida intimamente a éstas. Por tanto, la enzima debe usualmente ser separada de la célula, rompiendo la estructura celular; de lo contrario toda la célula debe ser utilizada como fuente de enzimas. Aunque el procedimiento anterior pueda ser llevado a la práctica para producir una enzima extracelular, por ejemplo mediante desintegración de las células con un desintegrador sónico o supersónico,



esta operación suplementaria requiere tiempo y es frecuentemente difícil de realizar a escala industrial.

5 El problema principal, cuando se utilizan células completas en la reacción de isomerización, consiste en que la preparación de enzimas tiende a ser inestable durante las múltiples transformaciones y por tanto no puede ser utilizada económicamente para su reciclado. Además, cuando se utilizan células vivas completas, se producen reacciones secundarias durante la isomerización en razón de la presencia de otro material enzimático, con lo cual se producen sustancias distintas de la fructosa.

10

De acuerdo con el invento, los inconvenientes descritos más arriba de la enzima de isomerasa de glucosa y de las preparaciones de enzimas de la técnica anterior se suprimen uniendo de manera covalente la enzima a las estructuras celulares y a otros componentes de la célula en la misma célula. Se incuban células completas con un agente reactivo de reticulación, es decir que tiene por lo menos dos grupos funcionales diazo. El agente reactivo de reticulación incluye un compuesto diamino aromático diazotizado primario. El producto de enzimas resultante es una preparación de enzimas inmovilizadas insolubles en agua que puede ser empleada para múltiples transformaciones de glucosa en las cuales no se detecta ninguna enzima activa, grupo diazo, ni material fluorescente, en el jara

15

20

25

be transformado después de retirar la preparación de enzimas inmovilizadas mediante filtración o centrifugación.

La preparación de las enzimas inmovilizadas es generalmente bien conocida. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos exigen un contacto de una enzima alta-

30

423247



mente purificada con un soporte insoluble en agua, que lleva grupos capaces de reaccionar de manera covalente o iónicamente con la enzima o que absorben la enzima. Mediante la utilización de la célula completa como vehículo para la unión covalente de la enzima de isomerasa de glucosa de acuerdo con el invento, se obtiene una ventaja considerable, evitando las varias fases de tratamiento de purificación de la enzima que eran necesarias hasta la fecha.

10 Aunque hasta ahora la unión de las enzimas solubles con las células completas se ha hecho incubando la enzima y las células microbianas en soluciones de sales de metales pesados, estas preparaciones de la técnica anterior presentan el inconveniente de que las sales empleadas son tóxicas. Además, estas preparaciones son insuficientemente estables para permitir un número de reutilizaciones importantes de la misma preparación de enzimas, en razón del hecho de que la enzima filtra fácilmente desde la pared de la célula hasta la solución ambiente.

15 20 Por tanto, el presente invento proporciona una composición de enzima de isomerasa de glucosa inmovilizada altamente estable y que puede ser reciclada en numerosas reacciones de transformación de glucosa sin pérdidas notables de la actividad enzimática. Se elimina así la necesidad de cualquier purificación sustancial de la preparación de enzimas crudas antes de su inmovilización y la enzima inmovilizada puede ser retirada fácilmente de la mezcla de reacción de dextrosa de maíz después de la transformación en glucosa.

25 30 El agente reactivo de unión transversal utilizado

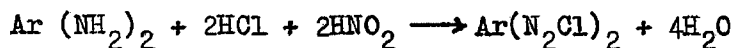
14 FEB



5 en este invento es un compuesto diamino primario diazotizado que puede contener por ejemplo benceno, bencidina, piridina, pirimidina, purina, acridina, tiazol, oxazol, benzotiofeno, cumarona, fenotiazina, o una estructura anular de fenoxazina y, preferentemente, es un compuesto diamino diazotizado heterocíclico primario que tiene de uno a tres anillos.

10 Los agentes reactivos de reticulación preferidos son la 2,6-diamino piridina diazotizada, la 2,4-diamino-6-hidroxi-pirimidina; la 3,6-diaminoacridina; la acriflavina; y otros compuestos diazotizados que contienen un radical piridina, pirimidina o acridina.

15 La diazotización de las aminas primarias anteriores puede ser realizada mediante reacción con ácido nítrico y con HCl para producir una sal de diazonio, por ejemplo;



Ar = por ejemplo, radical arilo de piridina, pirimidina, o acridina.

20 Un nitrito de metal alcalino, tal como el nitrito de sodio, puede ser utilizado en lugar del ácido nítrico en la reacción que antecede obteniéndose resultados equivalentes.

25 El método del invento puede ser llevado a la práctica con células microbianas vivas húmedas recién aisladas del fermentador, con células secadas en un disolvente tal como acetona, o células secadas en metanol, o con una mezcla heterogénea de proteínas como la que se produce en el cultivo de fermentación.

30 La unión covalente de la enzima con la estructura celular y otros componentes de la célula se realiza me-

423247

14 FEB. 1974



diante la incubación de las células completas con el agente reactivo de reticulación, preferentemente a una temperatura incluida entre 0°C y 25°C durante una a 100 horas aproximadamente. Una incubación realizada a 4°C. durante 5 48 horas aproximadamente es óptima.

Aunque la enzima de isomerasa de glucosa o la preparación de enzimas pueda ser obtenida a partir de numerosos microorganismos, tal y como se ha indicado más arriba, para las necesidades del invento es preferible obtener 10 la enzima o la preparación de enzimas a partir de las especies streptomyces y lactobacillus, por ejemplo, Streptomyces phaeochromogenes y Lactobacillus brevis. Estos microorganismos son bien conocidos, ya que los Streptomyces son miembros del orden Actinomycetales y Lactobacillus pertenecen al orden Eubacteriales. En particular, se aísla de 15 la tierra el Streptomyces phaeochromogenes según se describe por Conn (Actinomyces phaeochromogenus (sic), "N.Y. State Agr. Exp. Sta. Boletín Técnico Núm. 60", 1917, y por Waksman y Henrici [Streptomyces phaeochromogenus (sic)] en 20 Manual de Bergey, 6a. Edición 1948, en la página 943. El Lactobacillus brevis es muy ampliamente distribuido en la naturaleza, particularmente en plantas y productos animales, pero igualmente en tierras, y ha sido descrito por Orla-Jensen (Betabacterium breve). "La Bacteria del Ácido 25 Láctico", 1919, en la página 175, y en el Manual de Bergey, 4a. edición, 1934, en la página 312.

La preparación de la isomerasa de glucosa a partir de (1) especies Streptomyces y a partir de (2) bacterias de ácido láctico, es igualmente bien conocida y ha sido descrita, respectivamente, por (1) Takasaki, Agr. 30

14 FEB



Biol.Chem., Volumen 30, Núm. 12, páginas 1247-53 (1966),
Volumen 31, Núm. 3, páginas 309-13 (1967), y (2) Yamanaka,
Agr. Biol.Chem., Volumen 25, núm. 4, páginas 272-80 (1961),
Volumen 27, Núm. 4, páginas 271-78 (1963).

5 Aunque la mayoría de las especies Streptomyces son
organismos que utilizan D-xilosa, existen ahora ciertas
tendencias para producir encimas de isomerasa de glucosa
mediante la asimilación de xilano, que es mucho menos cog
toso que la D-xilosa. Incluso es innecesario usar xilano
10 puro para la formación de isomerasa de glucosa. Por tanto,
como fuente de xilano pueden utilizarse directamente ma-
terias primas tales como salvado de trigo, mazorca de
maiz y cáscara de maiz.

Otros ejemplos adecuados de Streptomyces phaeochro-
15 mogenes que emplean xilosa como fuente de carbono han sido
descritos por Sato y Tsumura, Agr. Biol. Chem., Volumen 29,
Núm. 12, páginas 1129-34 (1965), Patente Japonesa 17.640
(1966). La transformación enzimática de d-glucosa en D-fruce-
tosa ha sido demostrada en los extractos exentos de células
20 de cultivos Streptomyces phaeochromogenes realizados en
D-xilosa. Los organismos necesitan algunos metales; se ha
comprobado que el magnesio es esencial y que el cobalto
estimula la reacción.

Otros ejemplos específicos de Streptomyces phaeochro-
25 mógenes que pueden ser utilizados para preparar la enzima
de isomerasa de glucosa utilizada en el invento son tres
cepas utilizadas y depositadas por los Northern Regional
Research Laboratories y disponibles para el público bajo
las designaciones de código NRRL B-1131, B-1157 y B-3559.
30 Ejemplos adecuados de la preparación de isomerasa de glu-



cosa a partir de estas cepas han sido descritos por Strandberg, Bacteriology Proceedings, página 18, A 117 (1969); Strandberg and Smiley, Appl. Microbial, Volumen 4, núm. 4, páginas 588-93 (1971). En estas preparaciones la enzima ha sido quebrada por tratamiento sónico y parcialmente purificada mediante fraccionación con sulfato de amonio, seguida por dialisis y liofilización. De acuerdo con el invento, no es necesario realizar el tratamiento sónico, ni la purificación parcial.

La bacteria del ácido láctico y el Lactobacillus brevis, en particular, utilizan también generalmente xilosa para la producción de isomerasa de glucosa. En estos organismos, la actividad de isomerización de la D-glucosa acompaña usualmente la producción de isomerasa de D-xilosa. Yamanaka, Biochim. Biophys. Acta 151, páginas 670-80 (1968). Es conocido también que estos organismos necesitan ciertos iones metálicos para la producción de isomerasa de glucosa, en particular Co^{++} y Mn^{++} .

Otro ejemplo adecuado de Lactobacillus brevis es una cepa disponible en el Instituto de Fermentación, Osaka, Japón, designada por la referencia 3960 y descrita por Yamanaka, Ibid.

El microorganismo preferido para ser utilizado en el invento es el Streptomyces phaeochromogenes.

Otros ejemplos de microorganismos adecuados para producción de isomerasa de glucosa se describen en las Patentes de los Estados Unidos núms. 2.950.228; 3.616.221; 3.622.463; 3.623.953; 3.625.828; 3.645.848; 3.654.080; 3.666.628; y 3.689.362.

Los ejemplos que siguen ilustrarán más completa-



mente el invento, aunque queda entendido que el invento
no se limita a estos ejemplos específicos. En estos ejem-
plos, la isomerasa de glucosa -que contiene células com-
pletas- ha sido obtenida a partir de la fermentación de
5 Streptomyces phaeochromogenes en un medio de cultivo ali-
menticio que contiene una fuente asimilable de carbono y
de nitrógeno con trazas de minerales y una fuente de xila
no en condiciones aeróbicas sumergidas.

EJEMPLO 1

10 Se ha producido de la manera siguiente una prepa-
ración inmovilizada de células completas de isomerasa de
glucosa. Todas las soluciones se enfrían a 0° a no ser
que se indique lo contrario.

15 Se disolvieron 1,5 gramos de 3,6-diaminoacridina
en 235 ml. de HCl normal. Después de agitar la solución
durante 5 minutos a 0°C., se añadieron 56 ml. de una so-
lución molar 0,5 de NaNO₂ para realizar la conversión de
los grupos amino primarios en grupos diazo. Se agitó la
mezcla a 0°C. bajo vacío durante una hora. A continuación
20 se ajustó el pH en 8,5 con 6N de NaOH y se añadió una can-
tidad suficiente de CoCl₂ para obtener una concentración
final de 0,001 M. Las células completas secadas en aceto-
na (3 gramos) se pusieron en suspensión en 100 ml. de una
solución fría de Na₂CO₃ de concentración molar 0,1 conte-
25 niendo 0,001 M de CoCl₂. Se ajusta el pH en 8,5 con Hcl y
a continuación se añadió lentamente la mezcla de células,
bajo agitación, a la diazoacridina preparada más arriba
agitando a 4°C. durante 18 horas.

30 El precipitado resultante de células completas in-
movilizadas se aisló por centrifugación con un rendimiento



de 18 % de la actividad inicial (antes de la inmoviliza-
ción), se lavó tres veces con 300 ml. de agua, y se utili-
zó una parte para conversión de glucosa mediante suspen-
sión en una mezcla de reacción conteniendo 8 gramos de
5 glucosa, 0,03 M de trisacetato [acetato de tris (hidroxi-
metil) aminometano], pH 8,0, 0,06 M de $MgSO_4$ y 0,0006 M
de $CoCl_2$ obteniéndose un volumen final de 32 ml. La mezcla
de reacción se incubaba bajo agitación a $60^{\circ}C$. durante 24
horas. A continuación se aisló la enzima inmovilizada
10 mediante centrifugación y poniéndola nuevamente en suspen-
sión en una mezcla de reacción fresca y se repitió todo
el procedimiento de transformación varias veces hasta un
total de trece transformaciones.

En el procedimiento de transformación que antecede,
15 se utilizó como control de tiempo cero una muestra conte-
niendo 3 ml. de ácido tricloroacético al 25%. Las células
no tratadas secadas en acetona incubadas en 0,1 M de Na_2CO_3 ,
pH 8,5, que contienen 0,001 M de $CoCl_2$ se utilizan como
muestra de control para comparación.

En el proceso de transformación, se eligen condi-
20 ciones que no consiguen el equilibrio, con el fin de detec-
tar pequeños cambios en la actividad de las enzimas durante
el reciclado de las enzimas. Por tanto, se elige una can-
tidad de enzimas tal que se produzca una transformación al
25 25-30% de la glucosa en fructosa en el tiempo indicado.
Una mezcla de 42-45% de fructosa y 58-55% de glucosa es la
mezcla de equilibrio para la enzima.

El análisis de transformación se realiza sustan-
cialmente de acuerdo con el método de Tsurmura y Sato,
30 Agr. Biol.Chem., Volumen 29, página 1129 (1965) y se mide

423247

174 FEB



La fructosa por el método de cisteina-carbazol de Dische y Borenfreund, J. Biol. Chem., Volumen 192, página 583 (1951). Durante este análisis se incubaba la enzima durante 30 minutos a 60°C. en una solución que contiene 1,0 M. de glucosa, 0,1 M. de MgSO₄, y 0,001 M. de CoCl₂, obteniéndose un volumen final de 2,0 ml. Se añade una solución al 24% de ácido tricloroacético (0,2 ml) para detener la reacción y se mide a continuación la fructosa producida. En este análisis se define la unidad como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de fructosa en la mezcla de reacción.

La siguiente tabla indica el grado de conversión obtenido con las células reticuladas (inmovilizadas) en comparación con el grado de conversión obtenido con las células secadas en acetona, no tratadas, durante trece periodos de transformación. El número de conversión 1 se toma como grado inicial de conversión del sistema y todas las conversiones ulteriores se expresan como un porcentaje de esta cantidad.

Núm. de la Conversión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Grado de Conversión de las Células Inmovilizadas, por Ciclo	100	104	113	100	109	74	78	74	61	44	48	44	30
Grado de Conversión de las Células no Tratadas, por Ciclo.	100	13*											

* Interrumpido después de dos conversiones.

De acuerdo con los resultados que anteceden, puede verse que las células inmovilizadas presentan un incremen

423247

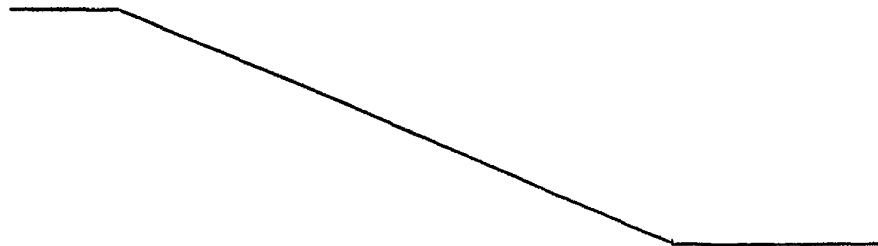


5 to marcado de estabilidad en comparación con las células no tratadas. Las células no tratadas han perdido la mayor parte de su actividad durante la segunda conversión mientras que las células inmovilizadas han conservado su actividad máxima durante cinco conversiones e incluso después de trece conversiones su actividad era todavía superior al doble de la de las células no tratadas solamente después de dos conversiones.

EJEMPLO 2

10 Se repitió el Ejemplo 1 con células húmedas frescas previamente aisladas de una masa de fermentación y lavadas tres veces con agua. Las células (15,2 gramos) se incubaron con 3 gramos de 3,6-diaminoacridina previamente diazotizada como en el proceso del Ejemplo 1. Después de
15 agitar a 4°C. durante 48 horas, se aislaron las células inmovilizadas mediante centrifugación con un rendimiento del 63% de la actividad inicial. Las células inmovilizadas fueron lavadas y una parte alícuota de las mismas se puso en suspensión en la mezcla de reacción y se sometió a
20 análisis como en el Ejemplo 1 para la transformación de glucosa en fructosa. Los controles se prepararon similarmente y se comprobaron como en el Ejemplo 1.

25 La tabla que sigue indica el grado de conversión obtenido con las células inmovilizadas en comparación con las células no tratadas secadas en acetona, durante veinte periodos de transformación.



423247

14 FEB



Núm. de la transformación.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5 Grado de transformación de las células Inmovilizadas, por ciclo.	100	110	107	107	100	97	90	83	76	83
Grado de transformación de las Células no Tratadas, por ciclo.	100	100	17	10	7	7*				

10

* Interrumpido después de seis transformaciones.

Núm. de la transformación.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
15 Grado de Transformación de las Células Inmovilizadas por ciclo.	72	59	69	83	86	97	83	59	48	48

20

Los resultados de la tabla que antecede indican la extraordinaria estabilidad de la enzima inmovilizada del invento, incluso después de veinte transformaciones, en cuyo momento conserva todavía casi el 50% de la actividad que tenía antes del primer ciclo.

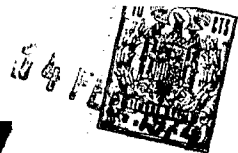
25

EJEMPLO 3

30

El compuesto de 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina, H₂O (1,5 gramos) se diazotizó de una manera análoga a la diazotización de 3,6-diamino-acridina del Ejemplo 1. El producto resultante se puso en contacto con células completas secadas en acetona como en el Ejemplo 1, y la mezcla

423247



de reacción se agitó durante 18 horas a 4°C. Las células inmovilizadas resultantes se aislaron con un rendimiento de 26% de la actividad enzimática inicial. Las células inmovilizadas se utilizaron para transformación en glucosa como en el Ejemplo 1.

La tabla que sigue indica el grado de transformación (expresado en porcentaje de la transformación inicial) obtenido con las células inmovilizadas durante nueve ciclos de conversión.

Núm. de la transformación.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado de Conversión de las Células Inmovilizadas por Ciclo.	100	90	59	67	57	39	28	31	23

EJEMPLO 4

El compuesto de 2,6-diaminopiridina (1,5 gramos) se diazotizó y a continuación se hizo reaccionar con células portadoras de enzimas como en el Ejemplo 1. Las células inmovilizadas se aislaron con un rendimiento del 15% de la actividad enzimática inicial. A continuación, se emplearon las células inmovilizadas para transformación en glucosa como en el Ejemplo 1, y en la tabla que sigue se indica el grado de transformación obtenido en cinco ciclos.

Núm. de la conversión.	1	2	3	4	5
Grado de Conversión de las Células Inmovilizadas por Ciclo.	100	50	36	32	27

423247



EJEMPLO 5

Se utilizaron varias concentraciones entre 0,5 y 6,0 gramos de 3,6-diaminoacridina diazotizada por 10 gramos de isomerasa de glucosa húmeda conteniendo células completas, para preparar células completas inmovilizadas mediante incubación de la mezcla a 4°C., bajo agitación durante 47-48 horas. Las preparaciones de enzimas inmovilizadas resultantes se aislaron mediante centrifugación, se lavaron y se analizaron como en el Ejemplo 1. Los rendimientos de actividad de enzimas inicial variaban entre 60% y 84%.

Los productos de enzimas inmovilizadas se comprobaron para determinar su estabilidad en conversiones múltiples en glucosa en una solución conteniendo 2,0 gramos de glucosa, una solución tampón de tris-acetato con concentración molar de 0,045 y pH de 8,0, 0,091 mol de Mg SO₄ y 0,00091 mol de CoCl₂, obteniéndose un volumen final de 22 ml. En estas conversiones, la muestra que utilizaba 6,0 gramos de agente de reticulación por 10 gramos de células completas conservó más del 50% de su rendimiento original de transformación hasta 10 transformaciones. De la misma manera, las muestras que utilizaban 0,5 gramos y 4,0 gramos del agente de reticulación mantuvieron más del 50% del rendimiento de conversión original hasta once transformaciones y las que utilizaban 1,0 y 2,0 gramos del agente de reticulación mantuvieron este nivel de transformación hasta catorce transformaciones. A título de comparación, las células no tratadas perdieron el 67% de su nivel original de conversión desde el tercer ciclo.

423247



EJEMPLO 6

5 Unas células vivas húmedas (15 gramos) fueron trata-
 das con acriflavina (cloruro de 3,6-diamino-10-metilacri-
 dinio) (3,72 gramos), diazotizada de una manera sustancial-
 mente similar a la que se empleó para la 3,6-diaminoacri-
 dina del Ejemplo 1, mediante incubación a 4°C. durante 47
 horas. Las células inmovilizadas resultantes se aislaron
 mediante centrifugación, se lavaron dos veces con agua, y
 a continuación, se comprobó su estabilidad para conversio-
 10 nes múltiples de glucosa en una solución conteniendo 4,0
 gramos de glucosa, 0,025 mol de una solución tampón de
 tris-acetato, con un pH de 8,0, 0,05 M de MgSO₄ y 0,0005
 M de CoCl₂.

15 La tabla que sigue indica el grado de transforma-
 ción obtenido con la enzima inmovilizada (células trata-
 das), y los controles no tratados en siete conversiones.

Núm. de la Con- versión.	1	2	3	4	5	6	7
20 Grado de Conver- sión de las Cé- lulas Inmovili- zadas, por ciclo	100	112	112	96	64	44	48
Grado de Trans- formación de las células no tra- tadas, por ciclo	100	41	16*				

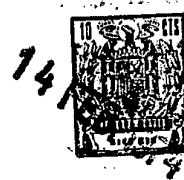
25

* Interrumpido después de tres conversione-s.

EJEMPLO 7

Unas células completas frescas (280 gramos) se pu-
 sieron en suspensión en 0,1 M de Na₂CO₃ conteniendo 0,001
 30 M de CoCl₂ con un pH de 8,5, y una parte alicuota conte-

423247



niendo 20 gramos de células (100 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas.

El compuesto de 3,6-diaminoacridina (24 gramos) se disolvió en 1.880 ml de 2N HCl y se enfrió a 0°C en un baño de hielo y sal. Se añadió 1N NaNO₂ a la temperatura del hielo (446 ml) y se agitó la mezcla a 0°C bajo vacío durante una hora. Se añadió una solución acuosa de CoCl₂ para obtener una concentración final de 0,0017M y se ajustó el pH en 8,5 con 10N NaOH.

A continuación se añadieron lentamente las células agitadas (20 gramos en 100 ml) bajo agitación en frío (0°C.) a una cantidad alícuota de 3,6-diaminoacridina diazotizada conteniendo 4 gramos de la 3,6-diaminoacridina original (452 ml). La mezcla de reacción se agitó a 4°C durante 48 horas, y en este momento se aislaron por centrifugación las células inmovilizadas resultantes. Se analizó el producto de acuerdo con el proceso del ejemplo 1 y se comprobó que el rendimiento era del 48%.

Unas muestras conteniendo de 50 a 300 unidades de actividad enzimática se incubaron en una solución conteniendo 2,0-2,2 gramos de glucosa, 0,05M de una solución tampón de tris-acetato, con un pH de 8,0, 0,1 M de MgSO₄, 0,001 M de CoCl₂ y agua para obtener un volumen final de 22 ml., durante 24, 48 y 72 horas a 60°C. en un baño de agua bajo agitación. Unas muestras conteniendo 3 ml. de ácido tricloroacético al 25% se utilizaron como controles de tiempo cero. En los tiempos indicados más arriba, las muestras se retiraron del baño de agua y el material insoluble se eliminó por filtración.

La concentración de fructosa en el producto de

423247



transformación se determinó de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 1. Se determinó la concentración de glucosa por el procedimiento de cromogeno de oxidasa de glucosa, descrito en el "Boletín Técnico Núm. 9", Ferenco Laboratories Division de G.D. Searle & Co., Método II, 5 página 5, 1966, igualmente indicado en general por Martinek, J. Amer. Medical Technologists, Volumen 29, Núm. 3, 1967.

En este procedimiento de análisis,

10
$$\% \text{ de Fructosa} = \frac{\text{Fructosa}}{\text{Glucosa} + \text{Fructosa}},$$

y en el punto de equilibrio la mezcla de reacción contenía 43% de fructosa y 57% de glucosa.

Otros compuestos diamino primarios aromáticos que pueden ser diazotizados y utilizados para la preparación de una composición de enzimas de isomerasa de glucosa 15 inmovilizada de la misma manera que los ejemplos anteriores, de acuerdo con el invento definido aquí, son el ácido 3,5-diamino-benzoico, el dihidrato de tetracloruro de 3,3-diaminobencidina y la 2,4-diamino-5-feniltiazol; y otros 20 microorganismos que pueden ser empleados para obtener células completas que contienen isomerasa de glucosa destinadas a ser empleadas en estos ejemplos son el Streptomyces bobilliae, S.albus, S.olivaceus y Lactobacillus brevis.

Los peritos en la materia podrán idear otros ejemplos y modificaciones de los ejemplos anteriores después 25 de leer la descripción que antecede y las reivindicaciones adjuntas, sin alejarse del espíritu y del alcance del invento. Todos estos ejemplos suplementarios así como las modificaciones de estos ejemplos están incluidos en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. 30

14 FEB



Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser tomados siempre en sentido amplio, no limitativo.

NOTA DE REIVINDICACIONES

5 Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de la firma BAXTER LABORATORIES, INC., con domicilio en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

10 1.- Mejoras introducidas en el procedimiento de transformación de D-glucosa en D-fructosa por medio de una enzima de isomerasa de glucosa, caracterizadas en que, previamente, se prepara la enzima de isomerasa de glucosa inmovilizada mediante la reacción de células microbianas completas que contienen enzimas de isomerasa de glucosa
15 con un compuesto diamino primario aromático diazotizado, utilizándose luego como enzima en la transformación la composición de enzimas de isomerasa de glucosa así obtenida.

20 2.- Mejoras introducidas en el procedimiento de transformación de D-glucosa en D-fructosa por medio de una enzima de isomerasa de glucosa, según la reivindicación 1, caracterizadas en que el compuesto diamino primario es elegido en el grupo que comprende 2,6-diaminopiridina; 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina; 3,6-diaminoacridina; y
25 acriflavina.

30 3.- Mejoras introducidas en el procedimiento de transformación de D-glucosa en D-fructosa por medio de una enzima de isomerasa de glucosa, según la reivindicación 1, caracterizadas en que la reacción se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 0°C y 25°C aproximada-

129



mente, durante 1 a 100 horas aproximadamente.

4.- Mejoras introducidas en el procedimiento de transformación de D-glucosa en D-fructosa por medio de una enzima de isomerasa de glucosa, según la reivindicación 1, caracterizadas en que las células microbianas completas se obtienen a partir de la fermentación de Streptomyces phaeochromogenes.

5

5.- "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL PROCEDIMIENTO DE TRANSFORMACION DE D-GLUCOSA EN D-FRUCTOSA POR MEDIO DE UNA ENZIMA DE ISOMERASA DE GLUCOSA".

10

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de veintiuna hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

15

Madrid, 14 de febrero de 1.974

P.A. de Baxter Laboratories, Inc.

Victor Gil Vega: