

472087
FECHA DE PRESENTACION
26 JUL. 1978



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|--|---------------------------------------|---|
| <p>60 PRIORIDADES:</p> | | |
| <p>61 NUMERO</p> | <p>62 FECHA</p> | <p>63 PAIS</p> |
| 77/23 846 | 27.07.77 | FRANCIA |
| 78/22 038 | 13.07.78 | FRANCIA |
| <p>64 FECHA DE PUBLICIDAD</p> | <p>65 CLASIFICACION INTERNACIONAL</p> | <p>66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA</p> |
| | C07G; C13K | |
| <p>67 TITULO DE LA INVENCION</p> <p>"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE COMPOSICIONES ENZIMATICAS PARA LA ISOMERIZACION DE GLUCOSA EN LEVULOSA"</p> | | |
| <p>68 SOLICITANTE (ES)</p> <p>RHONE-POULENC INDUSTRIES</p> | | |
| <p>DOMICILIO DEL SOLICITANTE</p> <p>75 PARIS 8e (Francia).- 22, Avenue Montaigne.</p> | | |
| <p>69 INVENTOR (ES)</p> <p>Guy LARTIGAU, Albert BOUNIOT y Michel GUERINEAU, que han cedido sus derechos a la firma solicitante.</p> | | |
| <p>70 TITULAR (ES)</p> <p>RHONE-POULENC INDUSTRIES</p> | | |
| <p>71 REPRESENTANTE</p> <p>D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.-</p> | | |

POOR QUALITY

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención ha conseguido composiciones a base de glucosa-isomerasa y la utilización de las mismas para la isomerización de la glucosa en levulosa.

5. Es muy conocido el empleo de la glucosa-isomerasa para la isomerización de la glucosa en levulosa. En general se utiliza la glucosa-isomerasa inmovilizada para obtener buenos resultados industriales y, especialmente para poder trabajar en continuo. Esta enzima es producida por diversos microorganismos. Se la puede extraer del caldo de cultivo y purificarla eventualmente, o bien se pueden utilizar directamente las células que la contienen, separadas del caldo, lo que es menos costoso.

10. Se han propuesto diversos métodos para inmovilizar las enzimas en general y la glucosa-isomerasa en particular. Se puede realizar esta inmovilización por absorción sobre soportes minerales, como carbón activo o diversos carbonatos u óxidos alcalinotérreos. Así, de conformidad con la patente francesa 2 201 341, se absorbe la glucosa-isomerasa sobre carbonato magnésico básico. Sin embargo, este procedimiento solamente se puede aplicar a la glucosa-isomerasa extracelular.

15. También se ha propuesto introducir las enzimas o las células que las contienen, en sustancias polímeras semipermeables, como poliamidas o los derivados de la celulosa, pudiéndose comunicar seguidamente a las composiciones obtenidas la forma de películas, fibras o partículas (patentes francesas 1 306 640, 2 016 102, 2 169 105).

20. Asimismo se ha propuesto incluir las células que

5. contienen la enzima en precipitados en forma de copos de polielectrolitos (patente francesa 2 145 486) y aumentar la resistencia mecánica de las composiciones obtenidas de esta manera por medio de la adición de compuestos minerales de magnesio, calcio, hierro y manganeso (patente francesa 2 295 966).

10. Si bien estos diversos procedimientos permiten obtener composiciones de una actividad enzimática satisfactoria o que presenten buena resistencia a la abrasión, en cambio no contribuyen en absoluto a alargar el período de vida de estas preparaciones, desde el punto de vista de su actividad enzimática. Generalmente este período de vida no sobrepasa los quince días.

15. Se sabe, por otra parte, que las glucosaisomerases que se utilizan habitualmente, para dar buenos resultados exigen la presencia de iones magnesio y eventualmente una pequeña cantidad de iones cobalto en el jarabe de glucosa que se ha de isomerizar. Esto exige que el jarabe de levulosa obtenido sufra un tratamiento de desionización
20. mediante intercambiadores de iones, lo cual incrementa el precio de coste de la levulosa.

25. Ahora se ha encontrado que se pueden obtener composiciones de glucosa-isomerasa intracelular, que presentan un período de vida aumentado y que solamente necesitan (o no necesitan) una pequeña adición de iones magnesio en el jarabe de glucosa que se va a isomerizar y ninguna adición de iones cobalto, incluyendo las células de microorganismos que contienen glucosa-isomerasa en plaquetas o filamentos de ésteres de la celulosa que encie-

rran, como carga, por lo menos un compuesto de magnesio poco soluble en agua y, eventualmente, un compuesto de cobalto también poco soluble en agua.

5. Se entiende por compuesto de magnesio poco soluble en agua, cualquier compuesto de magnesio cuya solubilidad sea tal que libere 1 mg y, a lo sumo 50 mg de iones magnesio por cada litro de agua.

10. Por compuesto de cobalto poco soluble en agua se entiende cualquier compuesto de cobalto cuya solubilidad sea tal que libere de 1 a 20, cuando mas, mg de iones cobalto por litro de agua.

15. Los microorganismos cuyas células se utilizan en las composiciones de esta invención, son los que producen una glucosa-isomerasa cuya acción enzimática se manifiesta en presencia de iones magnesio e iones cobalto. Sin limitar esta lista, se puede citar el aerobacter Cloacae, los Arthrobacter, Bacillus coagulans, Lactobacillus brevis, Streptomyces sp. (echinatus, flavovirens, achromogenes, albus, olivaceus, olivochromogenes, violaceoniger, 20. bikiniensis, venezuelae, etc...), Actinoplanes missouriensis, etc... El microorganismo preferido para emplear en la presente invención es el Streptomyces phaeochromogenes.

25. Los ésteres de celulosa utilizados para constituir las plaquetas o los filamentos, son con preferencia el diacetato o una mezcla técnica de diacetato y triacetato, como la que se emplea en la fabricación del colodión.

Se elige preferiblemente la carga de magnesio entre el óxido de magnesio, hidróxido magnésico, fosfato magnésico y carbobato básico de magnesio o sus mezclas,

por ejemplo, mezclas técnicas como el hidroxycarbonato de magnesio. Se prefiere como carga el fosfato tribásico de magnesio.

5. Se elige preferentemente la carga de cobalto, entre los compuestos de cobalto II, como el hidróxido de cobalto II, carbonato, ortofosfato u oxalato de cobalto II. Además, del lastrado de la preparación, estas cargas tienen la misión de adsorber la enzima y suministrar los iones magnesio y cobalto que necesita.

10. Asimismo se pueden utilizar en estas cargas, como compuesto insoluble de magnesio (y cobalto), resinas intercambiadoras de cationes que contengan grupos sulfónicos saturados de iones Mg^{++} o bien Mg^{++} y Co^{++} , secadas al aire a una temperatura de aproximadamente $50^{\circ}C$ y pulverizadas finalmente para obtener partículas inferiores a $0,25$ mm de diámetro. Se describen ampliamente estas resinas sulfónicas en la literatura (Ion exchange Technology F.C. NACHOD. Jack SCHUBERT Academic Press in New-York 1956).

15. En las composiciones enzimáticas de esta invención existen, por consiguiente, células de un microorganismo que contiene la glucosa-isomerasa, un éster celulósico y una carga en las cantidades que se definen a continuación.

20. La cantidad de éster celulósico empleada en dichas composiciones, expresada mediante el porcentaje en peso de producto seco respecto a las células secas de microorganismos, puede variar entre el 25 al 100 % y con preferencia alrededor del 50 %.

25. La carga, también calculada como materia seca,

puede representar del 5 al 100 % en peso de células secas y con preferencia un 50 % aproximadamente. La proporción relativa del compuesto magnésico y del compuesto de cobalto que forma la carga, puede variar, respectivamente, del 50 al 100 % y de 0 al 50 % del peso de la carga total.

Las proporciones máximas de las cargas y del éster celulósico pueden aumentarse más allá de los límites indicados anteriormente, pero evidentemente a expensas de la actividad enzimática del conjunto obtenido. Si se utiliza, por otra parte, demasiado poco éster, se obtiene un producto que presenta muy mala cohesión.

A continuación se definen las proporciones de células de microorganismos, éster celulósico y carga que interviene en las composiciones enzimáticas preferenciales de la invención. Las proporciones ponderales se refieren a materia seca de los diferentes elementos de las composiciones enzimáticas:

- 40 a 60 % en peso de células de microorganismos
- 20 a 30 % en peso del éster de la celulosa
- 20 a 30 % en peso de carga que representa el 15 a 20 % en peso de un compuesto magnésico y el 5 a 10 % ponderal de un compuesto de cobalto.

Se puede llevar a la práctica el procedimiento de la invención ventajosamente, de la manera que se indica a continuación.

Se separan por centrifugación las células del substrato que se han desarrollado a expensas del mismo, después de sufrir un tratamiento térmico del que resulta, entre otras cosas, una esterilización de la masa celular

y la destrucción de ciertas enzimas indeseables (como las proteasas) que son menos resistentes al calor que la glucosa-isomerasa. Seguidamente se seca el caldo obtenido hasta que alcance un contenido de materia seca del 20 al 95 % (preferentemente alrededor del 30 %).

5. Se mezcla íntimamente el caldo resultante con la carga de compuesto magnésico y, eventualmente, del compuesto de cobalto, siendo la proporción de esta carga total del 5 al 100 % del peso total de las células y preferentemente al 50 %.

10. Se adiciona a la mezcla obtenida de esta manera, el éster de celulosa (por ejemplo, la mezcla técnica de di- y triacetato mencionada antes), a razón del 25 al 100 % (con preferencia el 50 % aproximadamente) del peso de células secas y en forma de sol al 5 - 20 % (preferiblemente alrededor del 10 %) en un disolvente miscible en agua, preferentemente acetona.

15. Se añade al caldo obtenido que contiene el éster de celulosa, una mezcla de agua y disolvente, parecida a la que se emplea para formar el sol del éster de celulosa, a fin de comunicar a la mezcla final la consistencia adecuada para darle la forma con la que se pretende emplear. La cantidad de disolvente que se sabe añadir puede ser de 1 a 10 veces el peso de las células empleadas.

20. La cantidad de agua que se mezcla previamente con el disolvente debe ser de manera que, teniendo en cuenta la humedad de las células, el agua contenida en la mezcla final representa de 0,6 a 8 veces (con preferencia unas 3 veces) el peso del éster de celulosa utilizado, siendo

25.

también conveniente que la relación ponderal final agua/di-
solvente sea inferior a 0,2.

Estos límites de las proporciones relativas de
agua, disolvente y éster de celulosa condicionan las pro-
5. piedades del producto final : así con un defecto de agua
la porosidad de la estructura obtenida es débil, siendo
por tanto las capacidades de intercambio malas, por otra
parte, con un exceso de agua (o una cantidad de disolven-
te no suficiente) la falta cohesión al producto final o
10. retiene mal la enzima.

El orden para el empleo de los elementos no es
necesariamente el que se acaba de indicar, sino que puede
modificarse para una mayor comodidad de la fabricación.

Es preferible que las células sufran un ligero
15. tratamiento con glutaraldehído en el caso, bastante fre-
cuente, de que el modo de preparación de las células que
contienen la enzima dé lugar a paredes de células que de-
jan que la enzima difunda intensamente (según las condicio-
nes del cultivo de los microorganismos, su tratamiento tér-
20. mico o su separación). Se puede llevar a cabo este trata-
miento al final del cultivo o bien sobre el caldo celular,
preferentemente con el éster de celulosa pero antes de in-
troducir la carga (que entonces se ha de introducir en úl-
timo lugar), o bien finalmente, como se verá más adelante.
25. después de haber dado forma a la mezcla. En el caso de que
se efectúe el tratamiento con glutaraldehído sobre las cé-
lulas o sobre el caldo de las células y el éster, se utili-
za del 0,5 al 6 % (con preferencia un 3 % aproximadamente)
de glutaraldehído respecto al peso de células secas. La mez-

ola con glutaraldehído debe ser preferiblemente íntima y se deja que reaccione durante 10 minutos a 1 hora, entre 10 y 30° C.

5. Finalmente, puede homogeneizarse la pasta fluida obtenida, por ejemplo, mediante un agitador de hélice o turbina, conteniendo aquélla las células, la carga, el éster de celulosa, agua, disolvente y eventualmente glutaraldehído.

10. Entonces se puede extender esta pasta en capa fina (1 a 3 mm de espesor) y dejarla secar al aire a una temperatura de 15 a 30° C. Una vez que ha transcurrido aproximadamente una hora, cuando todavía no es quebradiza, se puede cortar en pequeños elementos de algunos milímetros de lado. Se prosigue el secado, después de despegar la pasta, pero evitando alcanzar la fase quebradiza.

15. En este estado de la preparación, si se desea, se puede realizar el tratamiento con glutaraldehído, humedeciéndolo en una solución acuosa de este cuerpo.

20. Entonces se puede utilizar el producto obtenido para isomerizar las soluciones de glucosa.

25. La fabricación de plaquetas de éster de celulosa, cargado del compuesto magnésico y de cobalto y que contiene la glucosa-isomerasa en forma intracelular como la que se ha descrito antes, constituye una forma preferida de la invención. Pero es posible dar forma a la pasta obtenida por cualquier otro medio conocido, concretamente por extrusión si se desea obtener filamentos en vez de plaquetas. Antes de proceder a un eventual secado de la masa de filamentos, se coagula su superficie inmediatamente después de

la extrusión por medio de una corriente de aire caliente o por inmersión en agua durante algunos minutos. Pueden conservarse las plaquetas y filamentos en estado seco o bien suspendidos en un líquido que, con preferencia, es agua con un antiséptico adecuado (por ejemplo formol).

5. Las plaquetas y filamentos de la invención presentan numerosas ventajas, especialmente para su empleo en continuo en una columna.

10. La estabilidad mecánica es muy buena, hasta al término de un período muy largo de su utilización. La pérdida de carga, cuando pasa la solución que se ha de isomerizar a través de la columna, es muy pequeña y es estable con el tiempo.

15. La vida de estas preparaciones es muy larga, la semiactividad o tiempo al término del cual la preparación posee la mitad de su actividad, excede fácilmente las 1000 horas. Además, el descenso de su actividad tiene lugar progresiva y regularmente.

20. La velocidad media de producción de levulosa por unidad de peso es elevada.

25. No es necesario añadir iones magnesio y cobalto en forma de sales solubles a las soluciones que se van a isomerizar, ya que son suficientes el magnesio y cobalto de la carga para activar la enzima. Sin embargo, en ciertos casos es posible añadir hasta 10 mg de iones magnesio por litro de solución a las soluciones que se han de isomerizar. Como quiera que sea, la cantidad de iones magnesio en el jarabe de levulosa obtenido no sobrepasa los 10 mg/l lo cual es totalmente aceptable desde el punto de vista aliment-

5. ticio. En cuanto al contenido de cobalto, no excede de 1 mg/ litro. Estas pequeñas cantidades de iones magnesio y cobalto, por consiguiente, no necesitan largas y costosas operaciones de purificación, estando, por otra parte, exento de impurezas el jarabe isomerizado.

Se pueden emplear las preparaciones de la invención para isomerizar la glucosa del modo que se señala seguidamente:

10. Se colocan los elementos de las preparaciones enzimáticas, plaquetas o filamentos muy cortos, en un cilindro vertical, por ejemplo de vidrio, rodeado de una envoltura recorrida por una corriente de agua que permite mantener la temperatura de 50 a 75° C (con preferencia 60° C aproximadamente). Se alimenta este cilindro, preferentemente desde arriba, con una solución acuosa de glucosa que
15. tiene una concentración máxima del 60 % en peso (preferiblemente alrededor del 45 %), encontrándose sumergida la preparación enzimática en el líquido. Se ajusta previamente el pH de esta solución alimenticia a 8-9 (con preferencia 8,5 aproximadamente), verbigracia con sosa. Es ventajoso regular el caudal de la alimentación para mantener
20. un coeficiente de transformación de la glucosa que sea constante a lo largo de la operación. Para una buena rentabilidad de la operación, dicho coeficiente es generalmente del orden del 40 al 50 % (preferentemente del 42 % aproximado). Por consiguiente, debe reducirse de modo progresivo
25. el caudal de alimentación a medida que va disminuyendo la actividad de la preparación.

Como se ha mencionado anteriormente, es inútil

5. adicionar iones cobalto a la solución de glucosa alimenticia y no es indispensable añadir iones magnesio, pero puede considerarse deseable una adición que alcance 10 mg por litro de solución. La solución saliente contiene en general de 2 a 10 mg/litro de iones magnésicos y el contenido de iones cobalto se sobrepasa nunca 1 mg/litro.

Ya no es necesario reajustar el pH durante el curso de la operación. El pH de la solución saliente es del orden de 7,5.

10. No se observa la aparición de ninguna coloración anormal en las soluciones salientes isomerizadas, excepto en las primeras horas del proceso. A fin de impedir esto, durante las primeras horas, se puede aumentar el caudal de alimentación de la solución de glucosa, de forma que se lave la columna. El aumento de la coloración de la solución entre la entrada y la salida del reactor permanece, en una marcha normal, inferior a 20 APHA. (NORMA ASTM D 1209-54).

20. En los ejemplos siguientes la levulosa formada se valora por medio de un método colorimétrico con antro- na, refiriéndose a soluciones de título conocido. [HALL- HOOL y KLEINBERG- Analytical Biochemistry, 50, p 337-343 (1972)].

25. Las actividades enzimáticas, expresadas en U/g representan el número de micromoles de levulosa formados en 1 minuto a pH 7,5 y a 60°C.

EJEMPLO 1

Se utiliza un caldo del 16 % de materia seca procedente de la centrifugación de una cuba de producción

- del *Streptomyces phaeochromogenes*. La actividad de las células es de 150 U por gramo de materia seca. Se coloca este caldo en una estufa ventilada a 35-40° C y se deja allí hasta obtener una pasta con un 30 % de materia seca. Se mezclan 52 g de esta pasta con 1,1 g de hidroxicarbonato de magnesio. Se añaden a la mezcla 69 cm³ de una solución acetónica de celulosa de 100 g/litro. Se adicionan 60 cm³ de acetona y se homogeneiza todo con la ayuda de un agitador a hélice (11 000 revoluciones/min) durante algunos minutos. Se extiende el caldo sobre las placas de vidrio de manera que forme una capa de 2 a 3 mm de espesor con la ayuda de un aparato para la preparación de placas de cromatografía en capa fina. Se dejan secar las placas al aire durante 2 horas y después se corta la preparación en plaquetas de 3 a 5 mm de lado. Se despegan estas plaquetas y se continúa el secado hasta un contenido del 80 al 90 % de materia seca. Se obtiene la composición enzimática siguiente: (los % se expresan en peso de materia seca).
- 20. - 66 % de células de microorganismos
 - 4,7% de hidroxicarbonato magnésico
 - 29,3% de acetato de celulosa

La medida de la actividad de estas plaquetas da 52 U/g que corresponde a un rendimiento de fijación próximo al 50 %.

Se cargan 25 g de la composición enzimática obtenida de esta manera, en un cilindro vertical de vidrio de 25 mm de diámetro, provisto de una envoltura doble por la cual circula agua a 60-61°C. Se alimenta el

- cilindro preparado así, con una solución de glucosa de 450 g/litro, encontrándose sumergida la composición enzimática en la solución. Se ajusta el pH de la solución de glucosa hasta 8,5-8,7 con la ayuda de sosa. Se regula el caudal alimenticio de forma que se mantenga un coeficiente de transformación constante del 42 %. Por consiguiente, debe reducirse progresivamente el caudal durante la operación. Al principio este caudal es de 65 cm³/hora. Al término de 900 horas ha disminuido hasta la mitad y se reduce a la cuarta parte cuando han transcurrido 2200 horas.
- 5.
- 10.

Si se para la operación en este instante, se valora la producción media de levulosa en 480 kg de la composición enzimática empleada.

- El contenido de iones magnesio en la solución saliente varía, en el curso de la operación, entre 10 y 2 mg/l.
- 15.

El pH de la solución saliente es próximo a 7,5.

- La estabilidad mecánica de la composición no se modifica y la pérdida de carga sigue inferior a 1 cm de agua por metro.
- 20.

EJEMPLO 2

- Se prepara una composición enzimática como se ha descrito en el ejemplo 1, exceptuando que se reemplaza el hidroxicarbonato de magnesio por 2,2 g de fosfato tribásico de magnesio $[Mg_3 (PO_4)_2 \cdot 8H_2O]$, y que las células utilizadas presentaban una actividad enzimática por unidad de peso de materia seca doble que la de las células del ejemplo 1. La composición enzimática obtenida es la siguiente: (los % están expresados en peso de materia seca)
- 25.

- 63 % de células de microorganismos
- 9 % de fosfato magnésico tribásico
- 28 % de acetato de celulosa

5. Se utiliza la composición tal como se ha descrito en el ejemplo 1. El caudal inicial es de 65 cm³/hora. Disminuye hasta la mitad al término de 1300 horas y se reduce a la cuarta parte cuando han transcurrido 1700 horas. El coeficiente de iones magnésicos en la solución saliente es del mismo orden que en el ejemplo anterior.

10. EJEMPLO 3

Se prepara una composición enzimática como se ha descrito en el ejemplo 1, con la excepción de que se utiliza como carga 1,1 g de hidroxicarbonato magnésico y 1,1 g de carbonato de cobalto II (CoCO₃). Se obtiene la siguiente composición enzimática : (los % se expresan en peso de materia seca)

- 63 % de células de microorganismos
- 4,5 % de hidroxicarbonato magnésico
- 4,5 % de carbonato de cobalto II
- 20. - 28 % de acetato de celulosa.

Se utiliza la composición del modo descrito en el ejemplo 1. El caudal inicial es de 75 cm³/hora. Cuando han transcurrido 1000 horas ha disminuido la mitad y se reduce a la cuarta parte al término de 2250 horas.

25. El contenido de iones magnésico en la solución saliente varía, durante la operación, entre 9 y 2 mg/l. El contenido de iones cobalto permanece inferior a 0,9 mg/l.

ENSAYO A

Se prepara, para comparación unas plaquetas

del modo descrito en el ejemplo 1, a partir del mismo caldo, pero sin añadir ninguna carga.

5. Se cargan las plaquetas terminadas en un reactor tubular. Las plaquetas se agrupan mal, pues tienden a flotar en la solución azucarada. La solución alimenticia no contiene magnesio. Se debe ajustar el pH de la solución alimenticia a 9-9,3, para asegurar a la salida un pH 7,5. Por esta razón, la solución saliente es un poco coloreada. A fin de obtener un coeficiente de conversión
10. del 42 %, debe limitarse el caudal inicial a 30 cm³/hora para una solución de glucosa de 450 g/litro. El caudal es inferior a 15 cm³/hora después de 100 horas de marcha.

EJEMPLO 4

15. Se prepara una composición enzimática como describe el ejemplo 1, exceptuando que se reemplaza el hidroxocarbonato magnésico por 2,2 g de fosfato magnésico tribásico $[Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O]$ y 1,1 g de carbonato de cobalto II ($CoCO_3$), y que las células utilizadas presentaban una actividad enzimática por unidad de peso de materia
20. seca dos veces mayor que la de las células del ejemplo 1.

La composición enzimática obtenida es la siguiente : (los % están expresados en peso de materia seca)

25. - 60,5 % de células de microorganismos
- 8,5 % de fosfato magnésico tribásico
- 4,2 % de carbonato de cobalto II
- 26,8 % de acetato de celulosa.

Se utiliza la composición tal como se ha des-

crito en el ejemplo 1. El caudal inicial es de 65 cm³/hora. Disminuye a la mitad al término de 1500 horas y se reduce a la cuarta parte cuando han transcurrido 1900 horas.

5. Las proporciones de magnesio y cobalto en la solución saliente son del mismo orden que en el ejemplo 3.

EJEMPLO 5

10. Se humedecen 25 g de plaquetas de composición enzimática, preparadas del modo que se describe en el ejemplo 1, en un volumen de agua suficiente para sumergirlas y que contenga 0,5 g de glutaraldehído. Se deja en contacto durante 30 minutos a 20°C.

15. Seguidamente se secan las plaquetas y se utiliza la composición tratada así para una operación de isomerización de glucosa, ejecutada en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. El caudal inicial es de 45 cm³/hora. Desciende hasta la mitad al término de 1500 horas.

Las proporciones de magnesio y cobalto en la solución saliente son del mismo orden que en el ejemplo 3.

EJEMPLO 6

20. En una cuba de producción del *Streptomyces phaeochromogenes*, hacia el final de la producción, se adiciona glutaraldehído a razón de 6 g para 100 g de materia seca. Se deja en contacto durante 1 hora, a pH 7,5 y a 25°C.

25. Se centrifugan las células y después se tratan como se describe en el ejemplo 1. El caudal inicial es de 77 cm³/hora. Disminuye hasta la mitad cuando han transcurrido 1100 horas y se reduce a la cuarta parte al término de 1600 horas.

Las proporciones de magnesio y cobalto de la

solución saliente son del mismo orden que en los ejemplos precedentes.

ENSAYO B

5. Se prepara una composición enzimática de la manera descrita en el ejemplo 1, pero sin adicionar carga e introduciendo 0,5 g de glutaraldehído (en forma de solución acuosa comercial al 25 %), al mismo tiempo que se mezcla la solución de acetato de celulosa al caldo de las células. Se utilizan 25 g de la composición obtenida para isomerizar, en el mismo cilindro que el del ejemplo 1, 10. una solución de glucosa de 450 g/litro a la que se añade 1,23 g/litro de $[Mg SO_4 \cdot 7H_2O]$. Se observa cierta dificultad para cargar el tubo y asegurar la buena circulación de la solución, pues las plaquetas tienden a flotar. 15.

El caudal inicial es de 48 cm^3 /hora. Disminuye la mitad cuando han transcurrido 1500 horas y se reduce a la cuarta parte al término de 2300 horas.

20. Se valora la producción de levulosa en 560 kg por kg de composición. Pero la proporción de iones magnesio en la solución saliente es de 100 mg/l, por lo que se necesita purificar esta solución mediante intercambiadores de iones.

EJEMPLO 7

25. Operando como se describe en el ejemplo 1, se prepara un caldo de células del 30 % de materia seca cuya actividad sea de 250 U/g. Se mezclan 100 g de este caldo con 13 g de $[Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O]$, 125 cm^3 de una solución de acetato de celulosa de 100 g/litro y 60 cm^3

- de acetona. Se homogeneiza el caldo obtenido y se introduce en el cilindro de una jeringa (bomba para lubricación) provista de un orificio de 2 mm de diámetro. La rosca, obtenida de esta manera por extrusión, va a parar a un
5. recipiente que contiene 2 litros de agua a 25° C. Los productos extrusionados se dejan dos minutos en el agua, se dejan escurrir y se secan en estufa ventilada a 35° C. Cuando pasan a ser quebradizos, lo cual tiene lugar cuando el contenido de materia seca es del 85-90 %, se
10. trituran groseramente para obtener bastoncillos de 3 a 8 mm de longitud y cuya composición es la siguiente : (los % se expresan en peso de materia seca),
- 54 % de células de microorganismos
 - 23,5 % de trifosfato magnésico básico
 - 15. - 22,5 % de acetato de celulosa.

Un ensayo de actividad demuestra que presentan una actividad de 85 U/g, correspondiendo a un rendimiento de fijación del 70 %.

- Se introducen 25 g de estos bastoncillos en un
20. tubo de ensayo de duración y con un caudal inicial de 120 cm³/hora de solución de glucosa de 450 g/l, no conteniendo magnesio, permite obtener un coeficiente de conversión a levulosa del 42%. Después de 600 horas de trabajo, el caudal es todavía de 60 cm³/hora.

25. Finalmente se observa que la producción global es de 525 kg de levulosa por kg de bastoncillos empleados, a la velocidad media de 15 kg al día.

EJEMPLO 8

Se prepara una composición enzimática como

- se describe en el ejemplo 7, exceptuando que se emplean como carga 10 g de $[Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O]$ y 3 g de carbonato de cobalto ($CoCO_3$). Los productos extrusionados que se obtienen y que poseen un contenido de materia seca del 85-90 %, se trituran para obtener bastoncillos de 1 a 8 mm de longitud, que presentan la siguiente composición :
- (los % se expresan en peso de materia seca),
- 54 % de células de microorganismos
 - 18,1 % de fosfato magnésico tribásico
 - 5,4 % de carbonato de cobalto
 - 22,5 % de acetato de celulosa.

En un ensayo de actividad se demuestra que presentan una actividad de 100 U/g, que corresponde a un rendimiento de fijación del 90 %.

- Se cargan 25 g de estos productos extrusionados en un tubo de ensayo de duración y se alimenta este tubo con 120 cm³/hora de una solución de glucosa de 450 g/l que no contiene iones cobalto y que contiene 10 mg/kg de soluciones de iones magnésicos en forma de fosfato : el coeficiente de transformación es del 42%. Después de 950 horas de marcha, todavía se tiene un coeficiente de transformación del 42 % para un caudal de 60 cm³/hora. En tal caso, la producción global es de 865 kg de levulosa por kg de bastoncillos empleados, a la velocidad media de 14 kg/día, si se para la producción cuando se alcanza el 25 % del caudal inicial, manteniéndose el coeficiente de transformación en un 42 %. La valoración de los iones metálicos del jarabe efluente señala un contenido de iones magnesio de 10 mg/l de solución isomerizada y 0,8 mg/l

de iones cobalto de la misma solución isomerizada.

EJEMPLO 9

5. Se prepara la misma composición enzimática, como la descrita en el ejemplo 8, pero sin adicionar el compuesto de cobalto.

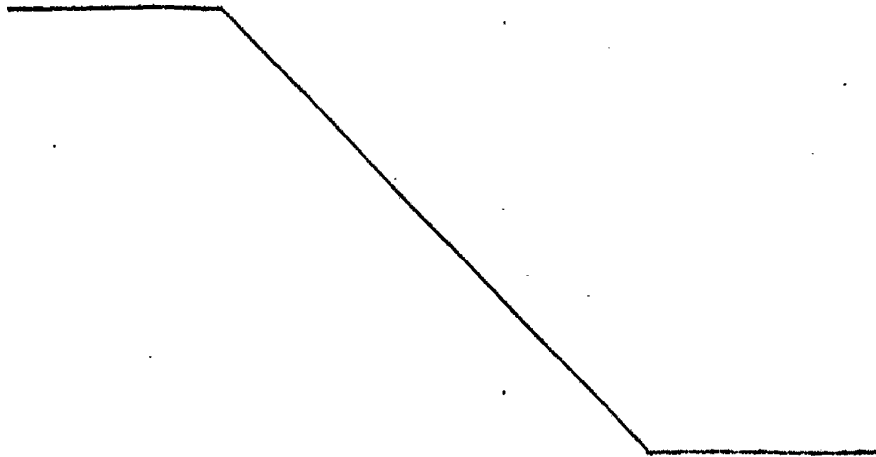
Se isomeriza una solución de glucosa con la ayuda de 25 g de productos extrusionados y operando en las condiciones descritas en el ejemplo 8. El caudal inicial es de 115 cm³/hora.

10. - Después de 600 horas de trabajo se tiene un coeficiente de transformación del 42% para un caudal de 58 cm³/hora,

15. - Se alcanza el 25% del caudal inicial, manteniendo el coeficiente de transformación el 42%, después de 1 300 horas.

- La producción global es de 620 Kg de levulosa por Kg de bastoncillos empleados, a la velocidad media de 9 Kg/día.

= . =



REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones.

5. 1. Procedimiento de preparación de composiciones enzimáticas para la isomerización de la glucosa en levulosa, que comprenden plaquetas o filamentos de óster de celulosa en las que se incluyen células de un microorganismo que contenga glucosa-isomerasa capaz de isomerizar la glucosa en levulosa, caracterizado porque para su realización se separan las células de los microorganismos del substrato a expensas del cual se han desarrollado, se deseca el caldo obtenido hasta un contenido en materia seca del 20 al 95% se mezcla el caldo desecado con un 5 al 100% en relación con el peso de las células, de una carga que comprende un compuesto magnésico poco soluble y eventualmente un compuesto de cobalto poco soluble; a la composición resultante se añade el óster celulósico, en razón del 25 a 100%, del peso de las células en forma de sol del 5 al 20%, en un disolvente miscible en agua, adicionándose una cantidad de disolvente igual a 1 - 10 veces el peso de las células secas y una cantidad de agua tal que la composición final contenga una proporción de agua que represente 0,6 a 8 veces el peso del óster de levulosa, siendo la relación ponderal final agua/disolvente inferior a 0,2, se da forma a la mezcla obtenida y se seca eventualmente,
2. Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en una forma preferente

- de su realización se separan las células de los microorganismos del substrato a expensas del cual se han desarrollado, se deseca el caldo obtenido hasta un contenido en materia seca de alrededor del 30%, se mezcla el caldo desecado con aproximadamente el 50% en relación con el peso de las células, de una carga que comprende del 50 al 100% de un compuesto magnésico poco soluble y 0 al 50% de un compuesto de cobalto poco soluble; a la composición resultante se añade el éster celulósico, a razón del 50% del peso de células secas; en forma de sol del 5 al 10% en un disolvente miscible en agua; más concretamente acetona, adicionándose una cantidad de disolvente igual a 1 - 10 veces el peso de las células secas y una cantidad de agua tal que la composición final contenga una proporción de agua que represente unas 3 veces, el peso del éster de celulosa, siendo la relación ponderal final agua/disolvente inferior a 0,2, se da forma a la mezcla obtenida y se seca lentamente la composición la conformada a una temperatura de 15 a 30°C.
5. 3. Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se somete a las células a un tratamiento con glutaraldehído, bien al término de su producción o bien en el seno del caldo de células y de éster celulósico, antes de añadir la carga, o bien en la composición conformada y seca.
10. 4. Procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la conformación de la composición se verifica por extensión sobre una placa en capa de 1 a 3 mm de espesor, secado parcial, cortado
- 15.
- 20.
- 25.

en plaquetas y complementado de secado.

5. Procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado en una variante del mismo porque la conformación de la composición se verifica mediante extrusión; coagulación de la superficie de los filamentos extrusionados por medio de aire caliente o por inmersión en agua y posterior secado.

10. 6. Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado en su realización porque los óxidos de celulosa que constituyen las plaquetas o filamentos en que se incluye el microorganismo, con diacetato de celulosa o una mezcla técnica de diacetato y triacetato de celulosa.

15. 7. Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado en su realización porque las células que contienen la glucosa-isomerasa, capaz de isomericar la glucosa en levulosa, son células de microorganismos ologidos entre el *Aerobacter cloacae*, *Arthro-bacter*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus brevis*, *Streptomyces* sp. (*phaeochromogenes*, *ochinatus*, *flavovirens*) *archro*rogones, *albus*, *olivaceus*, *olivochromogenes*, *violaceioniger*, *bikinionsis*, *venezuelas*) y *Actinoplanes missouriensis*.

25. 8. Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado en su realización porque el compuesto de magnesio poco soluble en agua, que participa como carga en la composición del caldo desecado se elige entre el óxido de magnesio, fosfato magnésico, el carbonato básico de magnesio y sus mezclas.

9. Procedimiento de conformidad con la reivin-

dicación 1, caracterizado porque el compuesto de cobalto poco soluble en agua, que así mismo participa como carga en la composición del cable desecado se elige entre el hidróxido de cobalto II, carbonato de cobalto II, ortofosfato de cobalto II o el oxalato de cobalto II.

10. Procedimiento de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque en una forma particular de su realización, la citada carga es una resina intercambiadora de cationes que comporta grupos sulfónicos, que ha sido saturada de iones Mg^{++} o bien Mg^{++} y Co^{++} ; secada y triturada.

11. Procedimiento de preparación de composiciones enzimáticas para la isomerización de glucosa en levulosa.

15. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 25 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 26 JUL. 1978

p. a. JAIME ISERN

p. p.

~~firmado: JOSE F. NIETO~~