

NUMERO	472.735
FECHA DE PRESENTACION	22-8-1978

10 A1



ESPAÑA

20 ENA. 1979

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
35368/77 Provisional	23-8-1977	Gran Bretaña
827.030	23-8-1977	EE.UU.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL CO7G	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

"METODO PARA ACTIVAR UNA FORMA DE MASA DE CELULAS DE GLUCOSA-  
-ISOMERASA"

71 SOLICITANTE (S)

NOVO INDUSTRI A/S (52764/AS)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

NOVO Allé, DL-2880 Bagsværd, Dinamarca

72 INVENTOR (ES)

Taje Kjær Nielsen, William Carasik, Lena Elisabeth Jensen de Zittar  
y Keith Gibson

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-69.590)

jga

La presente invención se refiere a una composición de glucosa-isomerasa que contiene hierro, y más en particular a una composición de glucosa-isomerasa en forma de partículas, que contiene al menos 0,050% en peso de hierro, incorporado en ella como sal de hierro.

Una dificultad básica con que se enfrenta esta técnica es que la enzima glucosa-isomerasa parecía requerir iones cobalto en el jarabe, y sin embargo el cobalto está ampliamente considerado como sustancia tóxica, y por tanto el nivel de cobalto presente en el iso-jarabe producto se ha de reducir al nivel de partes por billón, por ejemplo, por intercambio de iones del iso-jarabe producto. Antes de ahora, el enfoque empleado por los autores del presente invento y sus colaboradores era ajustar las condiciones de tratamiento de manera que no tuviese que haber iones cobalto presentes en el jarabe de alimentación para fines de activación de enzima. Como ejemplo de este enfoque se hace referencia a la patente de los EE.UU. 4.025.389.

Recientemente se ha observado que el hierro puede activar a las enzimas glucosa-isomerasa. Se ha sugerido la inclusión de pequeñas cantidades de una sal de hierro en el jarabe de alimentación, con fines de activación de la enzima. Sin embargo, se debe observar que los jarabes normales contienen a menudo pequeñas cantidades de hierro en forma soluble.

De todas formas, la introducción de sales de hierro solubles en la corriente de alimentación de jarabe de glucosa es más fácil de sugerir que de llevar a la práctica. Por una parte, el operario del sistema de isomerización de glucosa ha de tener un grado razonable de sofisti-

cación química, y el propio sistema debe ser sofisticado. La sal de hierro se ha de dosificar en el jarabe de glucosa. El análisis químico del jarabe de glucosa que entra en el reactor de isomerización, para determinar su contenido de hierro, se ha de hacer periódicamente, aunque solo sea como comprobación del funcionamiento satisfactorio del equipo de dosificación. Por otra parte, dado que la capacidad de la enzima para captar hierro es despreciable o, como mucho, limitada, es probable que se alcance el punto de saturación durante un largo periodo de funcionamiento del procedimiento de isomerización. En cualquier caso, en algún punto durante el procedimiento comenzará a fugar hierro a la corriente de producto. La presencia de hierro en el producto puede inducir la formación de color en medida que requiera su eliminación, por ejemplo por intercambio de iones, añadiéndose así a los costes de purificación. Resumiendo, la adición de sales de hierro al jarabe de glucosa es bastante molesta.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un producto de enzima que tiene hierro incorporado en él, dado que esto es generalmente más ventajoso, particularmente si el hierro estuviese retenido durante la vida útil del producto de enzima, y permaneciese tan firmemente unido que prácticamente no hubiese fuga de hierro en el uso de la enzima.

Según el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para activar una forma de masa de células de glucosa-isomerasa, comprendiendo dicho procedimiento incorporar en ella al menos 0,05% en p/p (base seca) de hierro como sal de hierro no tóxica, soluble en agua. La forma de masa de células se convertirá luego en una

forma en partículas, y se secará, para obtener un producto de enzima adecuado para venta en estado previo al empapamiento.

5 Según el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para activar una forma de masa de células de glucosa-isomerasa, comprendiendo dicho procedimiento incorporar en ella al menos 0,05% en p/p (base seca) de hierro, como sal de hierro sólida, no tóxica, soluble en agua. La forma de masa de células se convertirá  
10 luego en una forma en partículas, y se secará, para obtener un producto de enzima adecuado para venta en estado previo al empapamiento.

15 Según el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para activar una forma de masa de células de glucosa-isomerasa, según la descripción y/o reivindicaciones de la memoria descriptiva de la Patente Británica nº 1.516.704 y/o memoria descriptiva de la patente de los EE.UU. nº 3.980.521, comprendiendo dicho procedimiento incorporar en ella al menos 0,05% en p/p (base seca) de hierro como sal de hierro no tóxica soluble en agua.  
20 La forma de masa de células se convertirá luego en una forma en partículas, y se secará, para obtener un producto de enzima adecuado para venta en estado previo al empapamiento.

25 Según el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para activar una forma de masa de células de glucosa-isomerasa, según la descripción y/o reivindicaciones de la memoria descriptiva de la Patente Británica nº 1.516.704 y/o memoria descriptiva de la patente de los EE.UU. nº 3.980.521, comprendiendo dicho procedimiento incorporar en ella al menos 0,05% en p/p (base se-  
30

ca) de hierro, como sal de hierro sólida, no tóxica, soluble en agua. La forma de masa de células se convertirá luego en una forma en partículas, y se secará, para obtener un producto de enzima adecuado para venta en estado previo al empapamiento.

La invención proporciona también una forma de masa de células activadas por hierro, de glucosa-isomerasa, en forma en partículas secada, que tiene incorporada en ella al menos 0,05% en p/p de hierro como sal de hierro no tóxica soluble en agua. Preferiblemente, la forma de masa de células es según la descripción y/o reivindicaciones de la memoria descriptiva de la Patente Británica n.º 1.516.704 y/o patente de los EE.UU. n.º 3.980.521.

Así, la invención permite proporcionar un producto en partículas listo para empapar en solución de azúcar, antes de su uso en isomerización.

En la práctica, el uso de hierro como metal activador en las preparaciones de glucosa-isomerasa representa un significativo avance de la técnica, ya que se reconoce que el hierro en pequeñas cantidades es un material no tóxico. La sal de hierro añadida puede ser, naturalmente, de calidad para alimentos. Por tanto, desaparece el miedo de dejar sustancias tóxicas en el jarabe producto. Unas cuantas partes por millón de sal de hierro en el producto son permisibles.

La glucosa-isomerasa es una enzima intracelular que no es necesario aislar de las células del microorganismo para producir un producto de enzima activa (véanse, por ejemplo, las memorias descriptivas de las patentes de los EE.UU. n.º 3.821.086, 3.779.869 y 3.980.521). Tales pre-

paraciones usan la célula del microorganismo, entera o fragmentada, como base del producto de glucosa-isomerasa. Las expresiones "forma de masa de células", "preparación de masa de células" y "forma de masa de células en partículas" se emplean aquí para definir formas, preparaciones y partículas obtenidas, formadas o fabricadas de otra manera a partir de la sustancia de las células del microorganismo, junto con reaccionantes orgánicos, por ejemplo glutaraldehído, proteínas o agentes de aglomeración, por ejemplo polielectrolitos. En peso, el contenido de glucosa-isomerasa en una preparación de masa de células es normalmente una fracción muy pequeña de la preparación global.

Se ha descubierto ahora que las preparaciones de glucosa-isomerasa en masa de células pueden captar en ellas proporciones sustanciales de hierro, y además se pierde relativamente muy poco del hierro por contacto prolongado con jarabes de glucosa y de glucosa-fructosa. La cantidad de hierro que se puede incorporar en las preparaciones de masa de células excede con mucho de los requisitos para activación de la glucosa-isomerasa.

En particular, las sales de hierro no tóxicas solubles en agua, en forma sólida, se pueden mezclar e incorporar en la preparación de masa de células durante la formación de la misma, por ejemplo justamente antes de la extrusión de una forma en partículas. Las sales se podrían introducir también, en circunstancias apropiadas, como solución acuosa concentrada.

La presente invención abarca como producto una preparación de enzima en masa de células seca, con una sal de hierro no tóxica soluble en agua incorporada, en can

tidades de hierro de al menos 0,05% en p/p, generalmente de 0,05-2,0% en p/p, de la preparación de masa de células. Desde luego, se podría incorporar más hierro que 2,0% en p/p, pero no se conseguiría así ningún fin útil. El contenido preferido de hierro está comprendido entre 0,2 y 0,5% en p/p, especialmente de aproximadamente 0,2 a 0,25% en p/p.

En todos los casos, una vez incorporado el hierro dentro de la preparación de masa de células, en 0,05-2,0% en p/p, en base a peso en seco, se pierde poco o nada del hierro al jarabe durante la vida útil de la preparación para fines de isomerización de glucosa. Desde luego, la preparación de enzima que contiene hierro puede separar hierro del jarabe. Por ejemplo, un jarabe que entra en un reactor de isomerización con 4 ppm de hierro bien podría abandonar el reactor de isomerización con un contenido de hierro menor que 1 ppm de hierro.

En la práctica, se ha hallado que la mejora de la productividad y/o estabilidad de la glucosa-isomerasa puede tener lugar cuando también se mezclan otros ingredientes sólidos en la preparación de enzima. En particular, ha causado algunos problemas la caída inicial de pH que tiene lugar durante un periodo de 1-2 días tras cargar una columna con enzima fresca. Una disminución de pH en la columna es indeseable porque induce encogimiento del lecho de enzima, lo que a su vez puede conducir a formación de canales en el lecho. Además, puede derivarse de ello una disminución de actividad, y en los casos graves una estabilidad menor de la enzima producida. Se ha hallado que la incorporación de 0,5 a 3,0% en peso de óxido de magnesio, en base al peso en seco de glucosa-isomerasa, en la preparación de ma-

sa de células, supera la caída inicial de pH en grado sustancial, proporcionando así valores del pH de salida del jarabe relativamente estables. Además, a menudo se ha hallado que es deseable mezclar glucosa sólida (por ejemplo glucosa monohidratada), que sirve principalmente como diluyente coadyuvante de mezcla, con la preparación de masa de células, en cantidades de 2 a 15% en peso (base seca).

Las partículas preferidas de glucosa-isomerasa aquí consideradas son las preparaciones de células homogeneizadas que se han hecho reaccionar con glutaraldehído, descritas y/o reivindicadas en la memoria descriptiva de la Patente Británica nº 1.516.704 y/o memoria descriptiva de la patente de los EE.UU. nº 3.980.521.

En el modo preferido, la sal de hierro soluble en agua se mezcla con el óxido de magnesio y la glucosa, y luego se añade a la masa de células antes de la etapa de extrusión que forma el granulado final.

Aunque la práctica de la invención considera la incorporación de cualquier sal de hierro no tóxica soluble en agua en la preparación de masa de células de enzima, se prefieren ciertas sales de hierro, concretamente:

Sulfato férrico	Sulfato ferroso
Cloruro férrico	Lactato ferroso
Citrato férrico	Citrato ferroso
Citrato férrico-amónico	Acetato ferroso
Nitrato férrico	
Pirofosfato férrico	

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

En los ejemplos se usa la siguiente termino-

logía:

Definición de actividad

La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que forma fructosa a una velocidad inicial de 1  $\mu$ mol de fructosa por min, bajo un conjunto dado de condiciones de isomerización.

Determinación de la actividad

La actividad se determina bajo las siguientes condiciones:

10	Jarabe	40% en p/p dextrosa disuelta
	pH de entrada	8,5
	Mg <sup>++</sup>	0,004 M
	Temperatura	65°C
15	Diámetro de la columna	2,5 cm
	Altura de la columna	35 cm
	Dirección del flujo	descendente

La actividad se expresa en unidades IGIC por g.

En largos periodos de isomerización, las curvas de atenuación de la actividad se ajustan a modelos de atenuación exponencial de la forma:

$$\text{Act} = A_0 \times e^{-b \times t}$$

donde t es el número de horas tras el principio de la isomerización

Act es la actividad a t = t

A<sub>0</sub> es la actividad a t = 0

y b es la constante de atenuación, en hr<sup>-1</sup>

A partir de esta ecuación se define la vida mitad como  $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$ , dada en horas.

Productividad

La productividad se define como kg de dextrosa d.s. convertidos en una mezcla de 45% de fructosa y 55% de glucosa, por kg de enzima, tras un tiempo de isomerización dado.

En los ejemplos, la productividad se calcula según una ecuación de la forma antes dada, tras un tiempo de isomerización de  $2 \times T_{1/2}$ .

Hierro

El contenido de hierro se determina según el método de la o-fenantrolina (Nordisk Metodik Komite for Levnedsmidler nº 22, 1955 U.D.C. 664.7:546.72).

Color

El color se determina según el método CIRF.

Estabilidad del color

La estabilidad del color se determina tras 1 hora de calentamiento a 100°C a pH 4,2 (CIRF).

El óxido de magnesio empleado era el tipo pesado ER/B, de Pharmelko, Milán, Italia.

Ejemplo 1: Adición de citrato férrico, lactato ferroso y sulfato férrico en relación con óxido de magnesio y dextrosa. Adición de óxido férrico.

Se produjo una torta de filtración según el ejemplo V de la patente de los EE.UU. nº 3.980.521.

La torta se granuló mediante un granulador oscilante provisto de una malla con agujeros de 1 cm.

El granulado grueso contenía aproximadamente 76% de agua (medida por secado a 105°C). Se dividió en 6 lotes.

- 5  
10  
15  
20  
25  
30
- +) A. 8,5 kg de la torta de filtración granulada gruesa se extruyeron mediante un extrusor axial provisto de una malla con agujeros de 0,8 mm de diámetro. El extruido se secó en un lecho fluido con aire a 60-65°C, hasta un contenido de agua de aproximadamente 10%.
- B. A 8,5 kg de la torta de filtración granulada gruesa se añadió una mezcla de 20 g de óxido de magnesio, 85 g de dextrosa monohidratada y 40 g de citrato férrico con un contenido de hierro de 16%. Tras mezclar íntimamente, la mezcla se extruyó y secó como en A.
- C. 8,5 kg del granulado grueso se mezclaron con una mezcla de 20 g de óxido de magnesio, 85 g de dextrosa monohidratada y 40 g de lactato ferroso con un contenido de hierro de aproximadamente 19%. Tras mezclar íntimamente, la mezcla se extruyó y secó como en A.
- D. 8,5 kg del granulado grueso se mezclaron con una mezcla de 20 g de óxido de magnesio, 85 g de dextrosa monohidratada y 30 g de sulfato férrico con un contenido de hierro de aproximadamente 20%. Tras mezclar íntimamente, la mezcla se extruyó y secó como en A.
- +) E. 8,5 kg del granulado grueso se mezclaron íntimamente con una mezcla de 20 g de óxido de magnesio y 85 g de dextrosa monohidratada. La mezcla se extruyó y secó como se describe en A.
- +) F. 8,5 kg del granulado grueso se mezclaron íntimamente con 25 g de óxido férrico que contenía aproximadamente 58% de hierro. La mezcla se extruyó y secó como en A.
- +) Ejemplo comparativo
- Las preparaciones se tamizaron a entre 0,35

mm y 1,0 mm, y se analizaron los productos.

El pH se midió en la corriente de salida de jarabe, en muestras tomadas tras 20 horas y 43 horas, respectivamente. Antes de la determinación del pH, las muestras se enfriaron a 25°C.

Tabla I

Preparación	Actividad			pH del jarabe de salida tras	
	IGIC/g hallado	IGIC/g corregido	% de ganancia	20 hr	43 hr
+ ) A	246	246	0	6,68	7,62
B	307	326	33	7,99	8,20
C	296	315	28	7,60	7,98
D	308	328	33	7,90	8,14
+ ) E	254	267	8	7,99	8,20
+ ) F	257	260	6	6,86	7,65

+ ) Ejemplo comparativo

Como se puede ver por la Tabla I, solo la adición de componentes de hierro solubles da una ganancia de actividad que tiene importancia. La adición de óxido férrico solo dió aproximadamente 6%, en comparación con aproximadamente 30% para las sales solubles.

Ejemplo II: Adición de óxido de magnesio + dextrosa y óxido de magnesio + dextrosa + sal de hierro

Se produjo una torta de filtración según el ejemplo V de la patente de los EE.UU. nº 3.980.521. La torta se granuló mediante un granulador oscilante provisto de una malla con agujeros de 1 cm.

El granulado grueso contenía aproximadamente 79% de agua. Se dividió en 5 lotes de 8,5 kg.

+) A. 8,5 kg se extruyeron y secaron como en el ejemplo 1A, sin adición de aditivos.

+) B. A 8,5 kg de torta de filtración granulada se añadieron 25 g de óxido de magnesio. Tras mezclar íntimamente, se extruyó y secó como en A.

+) C. A 8,5 kg de torta de filtración granulada se añadieron 25 g de óxido de magnesio y 200 g de dextrosa monohidratada. Tras mezclar, se extruyó y secó como en A.

+) D. A 8,5 kg de torta de filtración granulada se añadió una mezcla de 25 g de óxido de magnesio y 300 g de dextrosa. Tras mezclar, se extruyó y secó.

E. 8,5 kg de la torta de filtración se mezclaron con una mezcla de 25 g de óxido de magnesio, 200 g de dextrosa monohidratada y 40 g de sulfato férrico que contenía aproximadamente 20% de hierro. Luego se extruyó y secó.

+) Ejemplo comparativo.

Las preparaciones secadas se tamizaron a entre 0,35 mm y 1,0 mm, y se analizaron los productos.

El pH del jarabe de salida se midió en muestras tomadas tras 20 horas y 43 horas, respectivamente, y enfriadas a 25°C.

5

10

15

20

25

30

2588

Tabla II

Preparación	% de material añadido	Actividad, IGIC/g		% de ganancia	pH del jarabe de salida tras	
		Hallado	Corregido por mat. inact. añadido		20 hr	43 hr
+ ) A	0	220	220	0	6,85	7,40
+ ) B	1	222	224	2	8,18	8,23
+ ) C	10	216	240	9	8,14	8,22
+ ) D	14	216	251	14	8,15	1,21
E	12	272	309	40	8,15	8,27

+ ) Ejemplo comparativo

Como se puede ver por la Tabla II, solo la adición de una sal de hierro proporciona un aumento significativo de actividad.

Ejemplo III: Adición de citrato férrico, pirofosfato férrico, citrato férrico-amónico y sulfato ferroso.

Una torta de filtración granulada gruesa con aproximadamente 76% de agua, como en el ejemplo I, se dividió en 6 lotes, cada uno de 8,5 kg.

+ ) A. 8,5 kg de torta de filtración granulada se extruyeron y secaron como en el ejemplo I, dando una composición de referencia.

B. A 8,5 kg del granulado grueso se añadió una mezcla de 25 g de óxido de magnesio, 25 g de citrato férrico con aproximadamente 16% de hierro, y 250 g de dextrosa monohidratada. Tras mezclar íntimamente, el granulado se extruyó y secó como en A.

C. 8,5 kg del granulado grueso se extruyeron y secaron como en A, tras adición de 25 g de

5

10

15

20

25

30

óxido de magnesio, 50 g de citrato férrico y 250 g de dextrosa monohidratada.

5

D. 8,5 kg del granulado grueso se trataron como en C, excepto en que los 50 g de citrato férrico se reemplazaron por 30 g de pirofosfato férrico con un contenido de hierro de aproximadamente 12%.

10

E. A 8,5 kg del granulado grueso se añadieron 25 g de óxido de magnesio, 250 g de dextrosa monohidratada y 30 g de citrato férrico amónico con un contenido de hierro de aproximadamente 15%. Tras mezclar íntimamente, el granulado se extruyó y secó como en A.

15

F. Al último lote de 8,5 kg se añadieron 25 g de óxido de magnesio, 250 g de dextrosa monohidratada y 30 g de sulfato ferroso con un contenido de hierro de aproximadamente 30%. Tras mezclar íntimamente, el granulado se extruyó y secó como en A.

+) Ejemplo comparativo

Las preparaciones secadas se tamizaron a entre 0,35 y 1,0 mm, y los productos obtenidos se analizaron. El pH del jarabe de salida se midió tras 20 y 43 horas.

20

Tabla III

	Actividad, IGIC/g		% de ganancia	pH del jarabe de salida tras		
	Hallado	Corregido		20 hr	43 hr	
25	+) A	229	229	0	6,64	7,25
	B	261	293	28	7,90	8,24
	C	273	306	34	7,84	8,22
	D	266	299	31	7,79	8,19
	E	268	301	31	7,70	8,14
30	F	263	295	29	7,87	8,03

2588

+) Ejemplo comparativo

No se observa diferencia significativa en el efecto activador de las sales de hierro aplicadas.

Ejemplo IV (comparativo): Efecto de la incorporación de óxi  
do de magnesio sobre la caída de pH, actividad y  
estabilidad.

a. Se produjeron tres preparaciones de enzima según el mismo método, como se describe en el Ejemplo I. A la torta de filtración granulada gruesa se añadió óxido de magnesio en cantidades suficientes para dar preparaciones con el siguiente contenido de óxido de magnesio en las preparaciones secadas finales.

Prep. B1 sin aditivo

Prep. B2 2% de óxido de magnesio

Prep. B3 5% de óxido de magnesio

Las isomerizaciones se efectuaron en columnas de vidrio encamisadas, de 60 ml (h x d = 35 x 1,5 cm), usando 15 gramos de cada una de las tres preparaciones. Los parámetros para la isomerización eran:

Jarabe	45% en p/p dextrosa redisuelta
pH de entrada	8,0 $\pm$ 0,1
Mg añadido al jarabe.	0,0008 M
Temperatura	65°C

Un pH de entrada de 8,0 es menor que el usado normalmente y considerado óptimo, pero aquí se aplicó para diferenciar el efecto de la adición de óxido de magnesio.

Las isomerizaciones se continuaron hasta que la actividad de las preparaciones hubo disminuído hasta una actividad elegida arbitrariamente, de 20-25  $\mu$ mol/min/g.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla IV (a) i

Preparación	Máxima actividad medida/tras horas	Tiempo de la Vida experiencia, horas	mitad, horas	Productividad tras 2 x T <sub>1/2</sub>
-------------	------------------------------------	--------------------------------------	--------------	---

5	B1	88/72	665	257	369
	B2	143/16	665	238	436
	B3	124/16	378	161	253

Los pH de salida de columna de los jarabes se hallaron según se tabula a continuación:

Tabla IV (a) ii

Preparación	Horas tras la iniciación							
	0 (empapamiento)	17	42	70	140	230	350	665
B1	-	6,2	6,2	6,1	6,0	6,0	5,9	6,3
B2	8,4	7,4	7,0	6,7	6,4	6,2	6,2	6,9
B3	9,3	8,6	7,7	7,2	6,7	6,4	6,3	-

Los resultados demuestran que la adición de 5% de óxido de magnesio origina pH de salida iniciales altos. Esto parece tener influencia sobre la máxima actividad observada, así como la estabilidad y productividad, en dirección descendente.

En este ensayo, isomerizando con un pH de entrada de 8,0, se tuvo como resultado una actividad máxima y productividad mayores por presencia de 2% de óxido de magnesio añadido, en comparación con cuando no hubo aditivos.

b. Para optimizar la adición de óxido de magnesio se produjeron cuatro preparaciones adicionales según el método descrito en el Ejemplo I. El contenido de aditivo en las preparaciones secadas fué:

30

2588

- A. sin óxido de magnesio
- B. 0,5% de óxido de magnesio + 9% de dextrosa
- C. 1% de óxido de magnesio + 9% de dextrosa
- D. 2% de óxido de magnesio + 9% de dextrosa

5

Las isomerizaciones se efectuaron en columnas de vidrio encamisadas, de 60 ml (h x d = 35 x 1,5 cm), usando los parámetros siguientes:

Jarabe 45% en p/p dextrosa redisuelta  
 pH de entrada 8,4 ± 0,1  
 Mg añadido al jarabe 0,0016 M  
 Temperatura 65°C

10

Las isomerizaciones se continuaron durante 351 horas.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

15

Tabla IV (b) i

Preparación	Máxima actividad medida/tras horas	Actividad tras 351 horas	Productividad tras 351 horas
A	103/67	79	397
B	105/18	75	384
C	103/18	72	371
D	98/18	65	354

20

Los pH de salida de columna del jarabe se midieron como se ve en la tabla:

Tabla IV (b) ii

25

Preparación	Horas tras la iniciación					
	19	43	67	140	210	303
A	6,6	6,7	7,0	7,3	7,4	7,2
B	7,1	7,0	7,3	7,5	7,5	7,1
C	7,4	7,6	7,7	7,6	7,6	7,2
D	8,4	8,0	7,8	7,6	7,5	7,2

30

Los resultados no indican grandes diferencias de actividad, estabilidad o productividad entre las cuatro preparaciones. Hay influencia sobre los pH de salida. La adición de 1% de óxido de magnesio da un pH de salida casi constante durante la experiencia, y por tanto es el nivel de adición preferido. Las adiciones de tanto 0,5 como 2% de óxido de magnesio tienen efecto sobre el pH de salida en comparación con el testigo, pero en ambos casos se halló alguna variación de pH durante las 150 horas primeras.

10 Ejemplo V: Experimentos de isomerización

Se usó para las siguientes preparaciones una torta de filtración granulada gruesa, preparada según la patente de los EE.UU. nº 3.980.521, Ejemplo V. La torta de filtración contenía aproximadamente 77% de agua.

- 15 +) 410/A Sin adición
- + ) 410/B Se añadieron aproximadamente 10 partes en peso de mezcla 1 a aproximadamente 90 partes en peso, en base seca, de la torta de filtración. La mezcla 1 consistía en dextrosa (100 partes) y óxido de magnesio (8 partes)
- 20 410/C Se añadieron aproximadamente 2 partes en peso de mezcla 2 a aproximadamente 98 partes en peso de la torta de filtración, en base seca. La mezcla 2 consistía en dextrosa (100 partes), óxido de magnesio (10 partes) y sulfato férrico (12 partes)
- 25 410/D Se añadieron aproximadamente 7 partes en peso de mezcla 2 a aproximadamente 93 partes en peso de la torta de filtración, en base seca
- + ) 410/E Sin adición
- + ) Ejemplo comparativo

30 Las mezclas 410/A a 410/E se extruyeron lue

go por una malla con agujeros de 0,8 mm, y luego se secaron en un lecho fluido hasta un contenido de agua de aproximadamente 10%.

Se determinaron los contenidos de hierro en las cinco preparaciones finales:

410/A	0,04%
410/B	0,03%
410/C	0,08%
410/D	0,18%
410/E	0,04%

Se efectuaron isomerizaciones con material de las preparaciones 410/A, 410/B, 410/D y 410/E, usando las siguientes condiciones:

Jarabe	45% en p/p dextrosa redisuelta
pH de entrada	8,4 ± 0,1
Mg <sup>2+</sup>	0,0016 M
Temperatura	62°C
Dimensiones de columna	h 40 cm
	d 5,8 cm
	v 1 litro
Peso de enzima	260 g

La enzima se empapó durante 2 horas a temperatura ambiente en el jarabe antes descrito, pero a pH 8,0, y luego se empaquetó en la columna.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla V (a)

Preparación	Máx. actividad medida	Tiempo total de la experiencia, horas	pH de salida tras			Vida mitad $T_{1/2}$ , horas	Productividad tras $2xT_{1/2}$ hr
			21 hr	48 hr	92 hr		
5 410/A	158	1293	6,9	6,8	7,2	842	1880
410/B	155	936	7,4	7,7	8,0	818	1790
410/D	202	1316	7,3	7,5	7,7	843	2295
410/E	151	1147	6,9	6,9	7,7	828	1755

10

Se determinó la concentración de hierro en el jarabe de salida de esas columnas:

Tabla V (b)

Preparación	Fe (ppm) en el jarabe de salida		
	2,5 horas tras la iniciación	21 horas tras la iniciación	27 horas tras la iniciación
15 410/A	< 1	< 1	< 1
410/B	< 1	< 1	< 1
410/D	aprox. < 1	< 1	< 1
410/E	< 1	< 1	< 1

20

Se efectuó un segundo conjunto de experimentos de isomerización con material de las preparaciones - 410/C, 410/D y 410/E, usando las siguientes condiciones:

Jarabe 45% en p/p dextrosa redisuelta

pH de entrada 8,4 ± 0,1

25

Mg<sup>2+</sup> 0,0016 M

Temperatura 65°C

Dimensiones de columna h 20 cm

d 2,5 cm

v 100 ml

30

Peso de enzima 20 g

La enzima se empapó durante una hora a temperatura ambiente en el jarabe antes descrito, y luego se empaquetó en la columna.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

5

Tabla V (c)

Preparación	Máx. actividad medida	Tiempo total de la experiencia, horas	pH de salida tras			Vida mitad $T_{1/2}$ , horas	Productividad tras $2 \times T_{1/2}$
			17 hr	45 hr	200 hr		
410/C	210	900	7,0	7,8	8,1	512	1510
410/D	250	900	7,5	8,0	8,2	484	1725
410/E	190	900	6,9	7,4	8,2	485	1340

10

Se determinó la concentración de hierro en el jarabe de salida de esas columnas:

15

Tabla V (d)

Preparación	Fe (ppm) en el jarabe de salida				
	0 hr (empapamiento)	24 hr tras la iniciación	72 hr tras la iniciación	140 hr tras la iniciación	850 hr tras la iniciación
410/C	0,8	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
410/D	3,6	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
410/E	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5

20

Se determinó el color CIRF del jarabe de salida de esas columnas:

25

Tabla V (e)

Preparación	Color CIRF en el jarabe		
	0 hr (empapamiento)	24 hr tras la iniciación	72 hr tras la iniciación
410/C	0,266	0,030	0,019
410/D	0,247	0,036	0,020
410/E	0,232	0,036	0,022

30

Para comparación, las medidas de color CIRF de tres muestras del jarabe de entrada usado durante este periodo fueron 0,019, 0,012 y 0,014.

Se determinó la estabilidad de color del jarabe de salida de esas columnas.

Tabla V (f)

Preparación	Estabilidad de color del jarabe		
	0 hr (empapamiento)	24 hr tras la iniciación	72 hr tras la iniciación
410/C	0,21	0,040	0,014
410/D	0,21	0,050	0,017
410/E	0,22	0,044	0,017

Para comparación, se midió la estabilidad de color de tres muestras del jarabe de entrada usado durante este periodo. Los resultados fueron 0,004, 0,002 y 0,004.

Se determinó el contenido de hierro en las preparaciones de enzima, antes y después del uso:

Tabla V (g)

Preparación	mg de hierro en la columna empaquetada con 20 g de enzima	
	A la iniciación	Tras 900 hr
410/C	16	24
410/D	36	42
410/E	8	14

Se observará que el contenido de hierro tras 900 horas era mayor que a la iniciación del experimento. Así, la enzima adsorbía hierro del jarabe de entrada. Dado que no se añadió hierro al jarabe de entrada usado en estos experimentos, el hierro adsorbido por la enzima estaba originado en las trazas de hierro naturalmente presente en las

soluciones de dextrosa cristalina. El análisis del contenido de hierro del jarabe con 45% en p/p de dextrosa redisuelta mostró  $< 0,5$  ppm, y aproximadamente  $0,1$  ppm de hierro. En el curso de las 900 horas que funcionaron esas columnas, se pasaron aproximadamente 75.000 g del jarabe por cada columna que contenía 20 g de enzima. Si la concentración media de hierro en este jarabe de entrada era  $0,1$  ppm, el contenido total de hierro en el jarabe de entrada era entonces  $75.000 \times 10^{-7}$  g = 7,5 mg.

Esto se corresponde bien con la cantidad captada por las preparaciones de enzima durante el curso del ensayo.

#### Conclusiones

La adición de óxido de magnesio tiene una influencia significativa sobre el pH de salida en el periodo entre 0 y 100 horas tras la iniciación. Con óxido de magnesio, como en 410/B y 410/D, el pH de salida era  $0,5-1,0$  unidades mayor que sin óxido de magnesio, como en 410/A y 410/E.

La adición de sal de hierro, como en 410/D, aumentó la actividad sin perjudicar a la estabilidad, originando un aumento global de productividad entre 20 y 30%.

La adición de menores cantidades de óxido de magnesio y sal de hierro, como en 410/C, dió un aumento menor del pH de salida y un aumento menor de productividad, pero esos aumentos aún eran significativos.

#### Ejemplo VI: Comparación de sales ferrosas y férricas

Se añadió una mezcla de sal de hierro, dextrosa y óxido de magnesio a muestras de una torta de filtración granulada gruesa, hecha según la patente de los EE.UU.

3.980.521, Ejemplo V. La mezcla se siguió tratando por extrusión a través de una malla con agujeros de 0,8 mm, y finalmente por secado en lecho fluido hasta un contenido de agua de aproximadamente 10%. La composición y cantidad de mezcla consistente en sal de hierro, dextrosa y óxido de magnesio fueron tales que dieron preparaciones finales con las siguientes composiciones:

Tabla VI (a)

Preparación	Sal de hierro	Dextrosa	Oxido de magnesio
IG 403 II C	1,2% sulfato férrico	8%	1%
IG 403 II D	1,2% sulfato ferroso	8%	1%
IG 403 II E	ninguna	8%	1%

El análisis de las preparaciones dió los siguientes resultados para el contenido real de Fe:

IG 403 II C	0,22%
IG 403 II D	0,27%
IG 403 II E	0,05%

Las isomerizaciones se efectuaron bajo las siguientes condiciones:

Jarabe	45% dextrosa redisuelta
pH de entrada	8,4 $\pm$ 0,1
Mg <sup>2+</sup>	0,0016 M
Temperatura	65°C
Dimensiones de columna	h 20 cm
	d 2,5 cm
	v 100 ml
Peso de enzima	20 g

La enzima se empapó durante una hora a temperatura ambiente en el jarabe antes descrito, y luego se empaquetó en la columna. Se obtuvieron los siguientes resul

tados:

Tabla VI (b)

Preparación	Max. actividad medida	Tiempo total de experiencia, horas	Vida mitad $T_{1/2}$ , horas	Productividad tras $2xT_{1/2}$
IG 403 II C	290	755	482	2093
IG 403 II D	274	755	467	1914
IG 403 II E	254	755	431	1635

Los contenidos de hierro en las preparaciones de enzima se determinaron antes y después del uso.

mg de Fe en la columna  
empaquetada con 20 g de enzima

Preparación	a la iniciación	tras 755 hr
IG 403 II C	44	52
IG 403 II D	54	68
IG 403 II E	10	16

De nuevo, el contenido de hierro aumentó ligeramente durante el curso del ensayo, indicando que las preparaciones adsorbían hierro de las trazas de hierro presentes en el jarabe de dextrosa redisuelta.

### Conclusión

La adición de sulfato ferroso o férrico aumentó la actividad y productividad de la preparación de enzima.

### Ejemplo VII: Demostración de la saturación de hierro

Se usó una torta de filtración granulada gruesa, según la patente de los EE.UU. nº 3.980.521, Ejemplo V, para las siguientes preparaciones:

415/A Sin adición

415/B Aproximadamente 10 partes en peso de mezcla 2 se añadieron a aproximadamente 90 partes en peso de

la torta de filtración, en base al peso en seco. La torta de filtración contenía aproximadamente 77% de agua. La mezcla 2 consistía en dextrosa (100 partes), óxido de magnesio (10 partes) y sulfato férrico (12 partes).

5 Las mezclas 415/A y 415/B se extruyeron luego a través de una malla con agujeros de 0,8 mm, y luego se secaron en lecho fluido, hasta un contenido de agua de aproximadamente 10%.

10 Se determinaron los contenidos de hierro en las dos preparaciones finales:

415/A 0,03%

415/B 0,26%

15 Las isomerizaciones se efectuaron con las preparaciones 415/A y 415/B usando las siguientes condiciones:

Jarabe	45% en p/p dextrosa redisuelta
pH de entrada	8,3 ± 0,1
Mg	0,0016 M
Fe	0,00007 M (4 ppm)
20 Temperatura	65°C
Dimensiones de columna h	20 cm
	d 2,5 cm
	v 100 ml
Peso de enzima	20 g

25 La enzima se empapó en el jarabe durante una hora a temperatura ambiente, y luego se empaquetó en la columna. Se obtuvieron los siguientes resultados:

30

2588

Tabla VII (a)

Preparación	Máx. actividad medida	Tiempo para alcanzar la máx. actividad, horas	Tiempo total de la experiencia, horas	Vida mitad $T_{1/2}$ , horas	Productividad tras $2 \times T_{1/2}$	
5	415/A	272	160	906	611	2560
	415/B	275	20	906	547	2260

Se determinó la concentración de hierro en el jarabe de salida de esas columnas:

Tabla VII (b)

10

Preparación	Fe (ppm) en el jarabe de salida a				
	0 horas (empapamiento)	20 hr	70 hr	350 hr	900 hr
415/A	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,5
415/B	7	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,6

15

Los contenidos de hierro en las preparaciones de enzima se determinaron antes y después del uso.

20

Preparación	mg de hierro en la columna empacquetada con 20 g de enzima	
	A la iniciación	tras 900 horas
415/A	6	320
415/B	52	380

Conclusiones

25

415/A dió una productividad 13% mayor que 415/B. Sin embargo, se debe observar que 415/B contiene aproximadamente 10% en peso de material no enzimático. Así, calculado en base a la torta de filtración original que contiene enzima, ambas preparaciones dieron aproximadamente la misma productividad.

30

La actividad de 415/A aumentó durante las primeras 160 horas de la experiencia. Esto contrasta con

415/B, que dió una actividad máxima tras 20 horas. Ello indica que 415/A estaba adsorbiendo hierro lentamente del jarabe de entrada, con la resultante activación lenta. Esta activación lenta es también la razón de la más larga vida  
5 mitad de atenuación exponencial observada para 415/A, es decir, la activación y la atenuación exponencial tuvieron lugar simultáneamente.

Durante las 900 horas del experimento se pasaron aproximadamente 90.000 g de jarabe por cada columna  
10 que contenía 20 g de preparación de enzima. El contenido de hierro en este jarabe era 4 ppm. Así, 90.000 g de jarabe contenían 360 mg de hierro. El contenido de hierro de las dos columnas aumentó en 314 y 328 mg. Así, la mayor parte del hierro del jarabe de entrada fué eliminada por las preparaciones de enzima. Los resultados muestran que tras 900  
15 horas el nivel de hierro en el jarabe de salida había empezado a aumentar. Esto sugiere que las preparaciones de enzima se estaban aproximando al límite de su capacidad para absorber hierro.

20

25

30

2588

1

5

REIVINDICACIONES

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Método para activar una forma de masa de células de glucosa-isomerasa, que comprende incorporar en ella al menos 0,05% en p/p (base seca) de hierro como sal de hierro no tóxica soluble en agua.

20

2ª.- Método según la reivindicación 1ª, en el que la sal de hierro se incorpora en forma sólida.

25

3ª.- Método según la reivindicación 1ª o 2ª, donde, tras incorporación del hierro, la glucosa-isomerasa se convierte en una forma en partículas, y se seca, para obtener un producto de enzima en estado previo al empacamiento.

30

4ª.- Un método según la reivindicación 1ª, 2ª ó 3ª, en el que la forma de masa de célula de glucosa-isomerasa se prepara por un método que comprende hacer reaccionar un concentrado de células, de al menos células de microorganismos parcialmente rotas que exhiben actividad de glucosa-isomerasa, con glutaraldehído, con lo cual se

1 forma un producto sólido coherente insoluble en agua.

5 5ª.- Método según cualquiera de las reivin-  
dicaciones precedentes, donde al menos 0,5% en peso de óxi-  
do de magnesio, basado en el peso en seco de la forma de  
masa de células de glucosa-isomerasa, y al menos 2% en  
peso (base seca) de glucosa sólida se mezclan con el hierro,  
y luego se añaden a la masa de células, tras lo cual la  
masa se extruye y se forman gránulos.

10 6ª.- METODO PARA ACTIVAR UNA FORMA DE MASA  
DE CELULAS DE GLUCOSA-ISOMERASA.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que  
antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta hojas escritas  
a máquina por una sola cara.

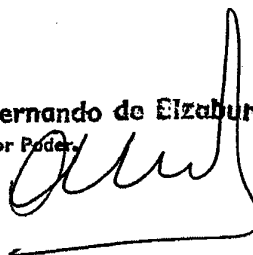
15

Madrid, 02.OCT.1978

P.A.

20

Fernando de Elizaburu  
Por Poderes



25

30

21098  
jga