

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo
con los datos que se han presentado y según el contenido de la memoria adjunta

ES

11	NUMERO
21	478.910
22	FECHA DE PRESENTACION
	26-Marzo-1.979

A1

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	890.500		27-3-78		E.U.A.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07C 7/02 // C02D 13/02		

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN AGREGADO DE CELULAS BACTERIANAS"

71 SOLICITANTE (S)
MILES LABORATORIES, INC. (U.S. Ser. No. 890.500)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
P.O. Box 40, 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana 46515, Estados Unidos de América

72 INVENTOR (ES)
GERALD BALTZER BORGLUM

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-71.303)

MCS/.

BAD ORIGINAL

FUNDAMENTO Y TECNICA ANTERIOR

La glucosa-isomerasa es una enzima que puede emplearse para catalizar la conversión de glucosa (dextrosa) en fructosa (levulosa). Es sabido que la glucosa-isomerasa puede producirse por fermentación de ciertos organismos, tales como Streptomyces flavovirens, Streptomyces echinatur, Streptomyces achromogenus, Streptomyces albus, Streptomyces olivaceus, Bacillus coagulans y similares, en medios nutritivos apropiados. La glucosa-isomerasa se forma dentro de las células bacterianas que se desarrollan durante su producción. Las células pueden ser separadas por filtración de la cerveza en fermentación, y pueden ser utilizadas directamente como fuente de glucosa-isomerasa. Sin embargo, el uso comercial directo de tales células bacterianas que contienen enzima, se ha visto estorbado por una desventaja principal. Las células perdían su actividad enzimática durante el uso y, por lo tanto, se reducía la vida útil de las células. Esta desventaja fue superada mediante el tratamiento de las células bacterianas con aldehído glutárico, como se describe en la patente de Estados Unidos 3.779.869. Técnicas adicionales para la inmovilización de la actividad enzimática en las células bacterianas, así como para la formación de agregados de tales células bacterianas que contienen enzima, se describen por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 3.821.086 y en sus reediciones, patentes de Estados Unidos 29.130 y 29.136, y en la patente sudafricana 73/5917. Las patentes de Estados Unidos arriba mencionadas, se refieren al uso de ciertos agentes de floculación polielectrolíticos, aniónicos y catiónicos. La patente sudafricana describe diversas combinaciones de aglutinantes, agen-

tes reforzantes y agentes de reticulación. Aunque las técnicas arriba mencionadas proporcionaban agregados de células bacterianas que conservaban generalmente su actividad enzimática durante el uso, existía todavía la necesidad de aumentar la dureza de los agregados, de tal manera que pudieran ser utilizados comercialmente en lechos de reactores de profundidad creciente. La patente de Estados Unidos 3.935.969 describe la adición de ciertos compuestos metélicos, en combinación con agentes floculantes polielectrolíticos, para mejorar la dureza. Sin embargo, esta técnica tiene una utilidad limitada.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se crea un procedimiento para la producción de un agregado de células bacterianas, que tiene una dureza mejorada. Este procedimiento implica el empleo de un producto de reacción reticulante de ácido glutárico y/o halogenuro cianúrico y un polímero particular de epihalohidrina-poliamina. En particular, esta invención se refiere a un procedimiento para producir un agregado de células bacterianas que comprende poner en contacto una masa de células bacterianas con un producto de reacción reticulante de (1) un material seleccionado de la clase que consiste en aldehído glutárico, halogenuro cianúrico y combinaciones de los mismos, y (2) un polímero catiónico, soluble en agua, obtenido por polimerización de una epihalohidrina con una alcoholenpoliamina que tiene la fórmula $R_1R_2NCH_2CH_2N$, donde R es un alcoholeno inferior que tiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y R_1 y R_2 son cada uno de ellos, un alcoholeno inferior de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, siendo la rela-

ción molar de epihalohidrina a poliamina de aproximadamente 0,60:1 a aproximadamente 2,7:1, comprendiendo dicha polimerización hacer reaccionar con la alcoholenpoliamina de aproximadamente 50 a aproximadamente 90% de la cantidad de epihalohidrina que ha de ser polimerizada, permitiendo que la reacción continúe hasta que el medio de reacción alcance una viscosidad sustancialmente uniforme, y hacer reaccionar la porción restante de la epihalohidrina por incrementos para obtener el polímero catiónico, siendo la temperatura de polimerización de aproximadamente 60°C a aproximadamente 120°C, y recoger el agregado resultante. Esta invención es especialmente útil cuando el agregado resultante se seca y seguidamente se rehidrata para su uso subsiguiente.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

El procedimiento de la presente invención puede ser utilizado con diversas células bacterianas que contienen la enzima. El resto de la memoria estará encaminado a la utilización del procedimiento con células bacterianas que contienen actividad de glucosa-isomerasa.

Las células bacterianas que contienen actividad de glucosa-isomerasa utilizables en el procedimiento de la presente invención, pueden ser producidas por métodos muy conocidos. Las células preferidas que contienen enzima se producen cultivando en condiciones aerobias sumergidas un cultivo de Streptomyces olivaceus NRRL 3583 o mutantes del mismo, en un medio que contiene agentes nutrientes apropiados. Esto se describe en la patente de Estados Unidos 3.625.828. Las células bacterianas resultantes se separan de la cerveza en fermentación, mediante filtración o cen-

trifugación.

Los ingredientes empleados en este procedimiento pueden adquirirse con facilidad. El aldehído glutárico y el halogenuro cianúrico, tal como tricloruro cianúrico, tribromuro cianúrico, triyoduro cianúrico y similares, pueden adquirirse en el comercio o pueden ser producidos por técnicas muy conocidas. El polímero particular de epihalohidrina-poliamina utilizado en este procedimiento, puede adquirirse en el comercio bajo la marca BETZ 1180, de la firma Betz Laboratories, Inc. Trevose, Pensilvania. El BETZ 1180 tiene un peso molecular inferior a un millón, contiene aproximadamente 0,288 milimoles de grupos amino por gramo de solución (basado en un ensayo con ninhidrina) y se vende en forma de solución que contiene un 30% en peso de sólidos, basado en el peso total de la solución. Este compuesto se describe en la patente de Estados Unidos 3.915.904. El compuesto se describe en ella como un polímero catiónico, soluble en agua, obtenido por polimerización de una epihalohidrina con una alcoholenpoliamina que tiene la fórmula $R_1R_2NRNSI_2$, donde R es un alcoholeno inferior que tiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y R_1 y R_2 son, cada uno de ellos, un alcoholeno inferior de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, siendo la relación molar de la epihalohidrina a poliamina de aproximadamente 0,60:1 a aproximadamente 2,7:1, comprendiendo dicha polimerización hacer reaccionar con la alcoholenpoliamina, desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 90% de la cantidad de epihalohidrina que ha de ser polimerizada, permitiendo que la reacción continúe hasta que el medio de reacción alcance una viscosidad sustancialmente uniforme, y haciendo

reaccionar la porción restante de la epihalohidrina, por incrementos, para obtener el polímero catiónico, siendo la temperatura de polimerización de aproximadamente 60°C a aproximadamente 120°C. Este material se denominará en lo que sigue "polímero de poliamina".

El producto de reacción de reticulación empleado en la presente invención para formar el agregado de células bacterianas, puede ser una de las tres posibles composiciones. El polímero de poliamina puede hacerse reaccionar con aldehído glutárico o con halogenuro cianúrico, o tanto con aldehído glutárico como con halogenuro cianúrico.

El aldehído glutárico y/o el halogenuro cianúrico, que se identifica colectivamente como componente (1), se hace reaccionar con el polímero de poliamina, el cual se identifica como componente (2), a un pH comprendido entre aproximadamente 6 y 10 y a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0 y 30°C, durante aproximadamente 0,5-2,5 horas. El producto de reacción de reticulación global contiene desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 77% en peso de componente (1) y desde aproximadamente 23 hasta aproximadamente 88% en peso de componente (2), basado en el peso total de ingredientes activos en los componentes (1) y (2). El contenido de aldehído glutárico del producto de reacción está comprendido entre aproximadamente 0 y aproximadamente 77% en peso, y el contenido de halogenuro cianúrico está comprendido entre aproximadamente 0 y aproximadamente 22% en peso, basado en el peso total de los ingredientes activos en los componentes (1) y (2).

La reacción entre el aldehído glutárico y el polímero de poliamina se realiza preferiblemente a pH 8-9, y a

una temperatura de aproximadamente 18 a 25°C, durante aproximadamente 0,5 horas. El aldehído glutárico debe estar presente en una relación molar de por lo menos un mol por mol de grupo amino en el polímero de poliamina, con el fin de evitar una reticulación indeseable del polímero de poliamina con el aldehído glutárico.

La reacción entre el halogenuro cianúrico sólo y el polímero de poliamina se realiza preferiblemente a pH 8-9 y a 0-10°C, durante aproximadamente 1 a 2 horas. El halogenuro cianúrico debe estar presente en una relación molar de por lo menos 1 mol por cada mol de grupo amino en el polímero de poliamina, con el fin de evitar una reticulación indeseable del polímero de poliamina con el halogenuro cianúrico. El halogenuro cianúrico, tal como el tricloruro cianúrico, tiene tres sitios reactivos halogenados. Uno de estos sitios reaccionará a 0°C o más, después de la reacción en el primer sitio, reaccionará el segundo sitio a 30-50°C y, el sitio final, reaccionará a 90-100°C. Es descable hacer reaccionar inicialmente solo el primer sitio del halogenuro cianúrico con el polímero de poliamina. Cuando el producto de reacción de reticulación resultante se hace reaccionar subsiguientemente con las células bacterianas y se calienta a temperaturas más altas durante el secado, reaccionarán entonces los sitios reactivos restantes del halogenuro cianúrico con el polímero de poliamina, para proporcionar una reticulación adicional al agregado de células bacterianas.

La reacción entre el polímero de poliamina y la combinación de aldehído glutárico y halogenuro cianúrico, se realiza por etapas. Primeramente, se hace reaccionar el

halogenuro cianúrico con el polímero de poliamina a un pH 8-9 y a 0-10°C, durante aproximadamente 1-2 horas. Preferiblemente, en esta situación los reaccionantes tienen una relación molar de 1 mol de halogenuro cianúrico por 2 moles de grupos amino del polímero de poliamina. Seguidamente, se añade una cantidad en exceso de aldehído glutárico, y se continúa la reacción, en las mismas condiciones de pH y temperatura, durante aproximadamente 0,5 horas.

El producto de reacción de reticulación empleado en la presente invención, no es un polielectrolito catiónico, ya que los grupos amino del polímero de poliamina que proporcionaban inicialmente la característica catiónica, han sido hechos reaccionar con el aldehído glutárico y/o halogenuro cianúrico y, por lo tanto, no se encuentran ya disponibles.

Los agregados de células bacterianas se preparan poniendo en contacto una masa de células bacterianas con el producto de reacción de reticulación preparado como se ha descrito antes a pH de aproximadamente 8 a 9 y a una temperatura de aproximadamente 0 a 30°C, durante aproximadamente 0,5-1,5 horas. El producto de reacción de reticulación se emplea en tal cantidad y concentración que las células bacterianas son puestas en contacto con aproximadamente 4,5 - hasta aproximadamente 60% en peso de los ingredientes activos del producto de reacción de reticulación, basado en el peso en seco de las células.

Una vez que ha tenido lugar la reacción anterior, el agregado de células bacterianas resultante se extruye - preferiblemente, o se conforma de otro modo en las configuraciones deseables, y se seca a unos 65°C durante varias -

horas. El agregado seco resultante puede almacenarse hasta que se le necesite subsiguientemente para utilizarlo en un procedimiento enzimático. En este momento, el agregado seco se rehidrata y se acondiciona para el uso. Un procedimiento de acondicionamiento ilustrativo se describe en la patente de Estados Unidos 3.974.036.

Una ventaja principal de la presente invención es un aumento de la dureza del agregado de células bacterianas, después de la rehidratación, en comparación con los agregados de células bacterianas de la técnica anterior. La dureza se expresa en relación con la resistencia a la compresión de las partículas de agregado de células bacterianas. Se empleó un aparato de ensayo de tracción Instron, utilizando una celdilla de carga de compresión N° CCT, de una manera similar a la descrita en la patente de Estados Unidos 3.935.069. Este instrumento puede adquirirse a Instron Corporation, Canton, Massachusetts.

Lo que sigue es el método de ensayo de la dureza después de la rehidratación:

Se prepara una solución para rehidratación, mezclando 9,68 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 28,0 g de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y 56,0 g de ácido cítrico anhidro en 600 ml de agua destilada a 45°C. Se agita la mezcla y se calienta a 60°C, para disolver todas las sales. Seguidamente, se enfría a 25°C y se ajusta a pH 8,5 con hidróxido sódico. A continuación, se filtra y se lleva hasta un volumen de 1,0 litros, con agua destilada. Una porción de 2,5 ml de la solución anterior se mezcla con 130 ml de agua, 70,3 g de dextrosa, 24,228 g de tris(hidroxiometil)aminometano y se ajusta a pH 8,55 a 25°C, con hidróxido sódico. Seguidamente, se lleva hasta 200 ml

con agua destilada.

Cinco partículas de agregado de células bacterianas secas, se cubren con 2,5 ml de la solución de rehidratación anterior en una placa petri y se calienta a 60°C -
5 en un baño de agua, durante una hora, dejándolo en reposo seguidamente a la temperatura ambiente, hasta que se enfríe. Las partículas se separan de la solución, se separa el exceso de líquido superficial y, seguidamente, se someten a ensayo en el instrumento Instron. El instrumento se
10 calienta moderadamente durante por lo menos 30 minutos, con la celdilla de carga acoplada, antes de ser utilizado para las determinaciones. Se ajusta la velocidad transversal a 5,1 mm/minuto y la velocidad del gráfico a 51mm/minuto. Se ajusta la "vuelta" al punto de detención a 0,965
15 mm para la superficie de la celdilla de carga. Se ajusta la "distancia entre trazos" para salvar el borde de la copa de muestra. Este es, usualmente, de 4,54 kg. Se normaliza el aparato registrador hasta leer cero kilogramos, con la copa de muestra sobre la celdilla de carga y 0,454 kg
20 con la copa y la pesa patrón de 0,454 kg sobre la celdilla de carga. Se coloca una sola partícula rehidratada sobre la copa de muestra, centrada con la cruceta. Se hace descender manualmente la cruceta hasta la parte superior de la partícula y se oprime el botón de "puesta en marcha".
25 Sobre el aparato registrador se lee la fuerza en kilogramos a una distancia de 0,762 mm desde el punto en el cual la cruceta toca a la partícula. De este modo, se expresa la dureza como la fuerza en "kilogramos" necesaria para comprimir la partícula 0,762 mm. Se repite el ensayo para
30 varias partículas, y se saca el promedio de los resultados.

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos ilustrativos.

EJEMPLO 1

Se obtuvo un producto de reacción de reticulación, añadiendo 2,25 g de solución BETZ 1180, que contenía 0,675 g de material activo y 0,648 milimoles de grupos amino, a 100 ml de aldehído glutárico al 1,25% (peso con relación al volumen), que contenía 13,24 milimoles de material activo a pH 9. Se agitó la mezcla durante unos 30 minutos y la solución se volvió de color amarillo. El producto resultante se formó a partir de una mezcla de reacción que contenía 64,9% en peso de aldehído glutárico y 35,1% en peso de polímero de poliamina, con relación al peso total del aldehído glutárico (componente 1) y del polímero de poliamina (componente 2).

Un cultivo de un mutante de *Streptomyces olivaceus* NRRL 3583 se desarrolló en un fermentador aireado y agitado que contenía un medio nutriente apropiado descrito en la patente de Estados Unidos 3.625.828. El caldo resultante en el fermentador, que contenía una masa de células bacterianas, se ajustó a pH 8,2, mediante la adición de materiales tampón apropiados. Una porción de la solución arriba preparada se añadió a una porción del caldo del fermentador, en la cantidad necesaria para proporcionar el equivalente de un 14% de aldehído glutárico (21,6% en peso del producto de reacción total), con relación al peso en seco de las células bacterianas. Al cabo de 30 minutos de tiempo de reacción, a 25°C y a pH 8,2, se filtró el caldo tratado. La torta de filtración se extruyó seguidamente a través de una abertura de jeringa de 2,2 mm. Los filamentos extruídos

resultantes se cortaron en tramos individuales de 30 mm, y se secaron durante la noche a 65°C, en una estufa de aire caliente de tiro forzado. Una porción similar del caldo del fermentador se trató con aldehído glutárico solo, con una concentración de 14% en peso con relación al peso en seco de las células bacterianas. Seguidamente, se filtraron las células tratadas, se extruyeron y se secaron de la misma manera para producir partículas testigos. Se ensayó la dureza, tanto de los materiales testigos como de los materiales tratados con el producto de reacción de reticulación. La muestra de control tenía una dureza de 0,364 kg, mientras que el producto preparado de acuerdo con la presente invención, tenía la dureza mejorada de 1,27 kg.

EJEMPLO 2

Porciones de caldo del fermentador de Streptomyces olivaceus similares a las del Ejemplo 1, se trataron con aldehído glutárico solo (testigo) y con diversas combinaciones de productos de reacción de reticulación, a pH 9 y 29°C. Los diversos productos de reacción de reticulación se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 anterior, utilizando diversas cantidades de aldehído glutárico y de polímero de poliamina. Seguidamente, las células bacterianas tratadas se filtraron, se extruyeron, se secaron y se sometieron a ensayo de dureza. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla I.

TABLA I

Mezcla de reacción para la composición del producto de reacción de reticulación (tanto por ciento en peso)

	<u>Aldehído glu- tárico</u>	<u>Polímero de poliamina</u>	<u>Cantidad añ dida (tanto por ciento en peso)</u>	<u>Dureza, Kg.</u>
5	100 (Control)		13,9	0,82
	76,7	23,3	13	1,23
	40,0	60,0	34,7	1,23
	44,4	55,6	18,7	1,5
	65,1	34,9	29,8	1,64

10 Puede verse que el uso del producto de reacción de reticulación permite obtener convenientemente una dureza mayor en comparación con el uso de aldehído glutárico solo, de la técnica anterior.

EJEMPLO 3

15 Se obtuvo un producto de reacción de reticulación, disolviendo 0,188 g de tricloruro cianúrico (0,64 milimoles), en 10 ml de acetona y añadiendo, seguidamente, esta solución, con agitación, a 70 ml de agua y hielo, para obtener un precipitado finamente dividido. Una porción de -

20 12,25 g de solución BETZ 1180 (que contenía 0,675 g de material activo y 0,648 milimoles de grupos amino) se diluyó con 20 ml de agua y se añadió a la suspensión de tricloruro cianúrico. La mezcla resultante se agitó y se mantuvo a pH 9 y a 0-5°C, durante 1-2 horas y, seguidamente, se diluyó

25 a 100 ml. El tricloruro cianúrico disuelto indicaba la reacción con la poliamina. Este producto de reacción resultó de una mezcla de reacción que contenía 21,8% en peso de tricloruro cianúrico como componente (1), y 78,2% en peso de polímero de poliamina como componente (2). Una porción

30 del caldo del fermentador de Streptomyces olivaceus, simi-

lar al del Ejemplo 1, se mezcló con una porción del producto de reacción anterior, para obtener una concentración de 32,0 por ciento en peso de producto de reacción basado en el peso en seco de las células bacterianas. Se añadió una solución acuosa de bicarbonato sódico al 0,2 por ciento (peso con relación al volumen), para mantener el pH a 9. Al cabo de 1,5 horas a pH 9 y 25°C, se filtró el caldo tratado, se filtró, se extruyó y se secó como se describe en el Ejemplo 1. Otra porción del caldo del fermentador se trató como antes, durante 0,5 horas. Inicialmente, no se añadió bicarbonato sódico, pero las células filtradas se lavaron con solución de bicarbonato sódico al 1 por ciento en peso, a pH 9, antes de la extrusión y del secado. Para la muestra testigo, se añadió aldehído glutárico a una porción separada del caldo del fermentador, con una concentración de 14 por ciento en peso con relación al peso en seco de las células bacterianas. Las células se trataron con aldehído glutárico durante 30 minutos, a pH 8,2 y 25°C, antes de la filtración, de la extrusión y del secado. La muestra testigo dió una dureza de 1 kg, mientras que el tratamiento con el producto de reacción durante 0,5 horas, produjo una dureza de 1,73 kg, y el tratamiento con el producto de reacción durante 1,5 horas, produjo una dureza de 1,82 kg.

EJEMPLO 4

Se obtuvo un producto de reacción de reticulación añadiendo 4,5 g de solución BETZ 1180 (que contenía 1,35 g de material activo y 1,296 milimoles de grupos amino) a 0,118 g (0,64 milimoles) de tricloruro cianúrico finamente dividido en agua y hielo. Se ajustó el pH a 9 y se mantuvo a pH 9, en un baño de hielo (0°C), durante 2 horas. Segui-

5 -damente, se añadieron 1,25 g (13,24 milimoles) de aldehido glutárico a pH 9, y se mantuvo la temperatura baja durante aproximadamente 0,05 horas. Se desarrolló un color amarillo oscuro. El producto de reacción resultó a partir de una mezcla de reacción que contenía 4,3% en peso de tricloruro cianúrico, 46,0% en peso de aldehido glutárico (total de 50,3% en peso de componente 1) y 49,7% en peso de polímero de poliamina como componente (2). Una porción de un caldo del fermentador de Streptomyces olivaceus similar al del -

10 Ejemplo 1, se mezcló con una porción del producto de reacción anterior, para proporcionar una concentración de 30,4% en peso de producto de reacción con relación al peso en seco de las células bacterianas. Al cabo de un período de -

15 reacción de 0,5 horas, a pH 9 y 25°C, el caldo tratado se filtró, se lavó con solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% a pH 9, se extruyó y se secó. Se preparó una muestra de control de la manera descrita en el Ejemplo 3. La muestra testigo produjo una dureza de 0,364 kg, mientras que el producto de reacción de reticulación produjo una dureza de

20 1,73 kg.

EJEMPLO 5

25 Porciones de caldo del fermentador de Streptomyces olivaceus similar al del Ejemplo 1, se trataron con aldehido glutárico solo (testigo) y con diversas combinaciones de productos de reacción a pH 9 y a 25°C y 5°C. Todos los productos de reacción de reticulación emplearon 1 mol de tricloruro cianúrico por cada 2 moles de grupos amino del polímero de poliamina. Las cantidades globales de aldehido glutárico y de polímero de poliamina se ajustaron seguidamente para producir las combinaciones expuestas en la Tabla

30

II siguiente. Seguidamente, las células bacterianas tratadas se filtraron, se extruyeron, se secaron y se sometieron a ensayo de dureza. Los resultados se muestran en la Tabla II siguiente.

5

TABLA II

Composición de la mezcla de reacción para el producto de reacción de reticulación (%)

	<u>25°C</u>				
	<u>Aldehido glutárico</u>	<u>Tricloruro cianúrico</u>	<u>Polímero de poliamina</u>	<u>Cantidad añadida (% en peso)</u>	<u>Dureza, kg</u>
10	100 (Control)	-	-	7	0,55
	30,6	5,1	64,3	6,5	1,05
	18,2	6,0	75,8	38,4	0,96
	47,4	3,8	48,8	29,5	1,41
	-	12,8	87,2	55,0	1,50
15	<u>5°C</u>				
	100 (Control)	-	-	7	0,55
	52,0	3,5	44,5	13,5	2,0
	18,8	5,9	75,3	15,9	2,6

20 Debe señalarse que en todos los ejemplos anteriores, las células bacterianas tratadas con los productos de reacción de reticulación tenían todas ellas valores de dureza significativamente aumentados en comparación con las células bacterianas tratadas con el aldehido glutárico solo de la técnica anterior.

25 Cuando se utiliza un producto de reacción de reticulación obtenido a partir de aldehido glutárico y polímero de poliamina, se produce la composición preferida a partir de una mezcla de 57,1% en peso de aldehido glutárico como componente (1) y 42,9% en peso de polímero de poliamina como componente (2), basado en el peso total de los

30

ingredientes activos de los componentes (1) y (2). Esta -
composición se emplea también preferiblemente, en una can-
tidad de 17,5% en peso, basado en el peso en seco de las -
células bacterianas.

5

Cuando se utiliza un producto de reacción de reti-
culación obtenido a partir de aldehído glutárico, tricloru-
ro cianúrico y polímero de poliamina, la composición prefe-
rida se produce a partir de una mezcla de 54,9% en peso de
aldehído glutárico y 3,6% en peso de tricloruro cianúrico -
10 como componente (1), y 41,5% en peso de polímero de poli-
amina como componente (2), basado en el peso total de los
ingredientes activos de los componentes (1) y (2). Esta -
composición se emplea también preferiblemente, en una can-
tidad de 18,2% en peso con relación al peso en seco de las
15 células bacterianas.

Los agregados bacterianos producidos de la manera
descrita arriba, eran todos ellos capaces de convertir la
glucosa en fructosa. La actividad de glucosa-isomerasa no
fue perjudicada por el uso de este nuevo procedimiento.

20

25

30

REIVINDICACIONES

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:

1ª.-Un procedimiento para obtener un agregado de células bacterianas, que comprende poner en contacto una masa de células bacterianas con un producto de reacción de reticulación de (1) un material seleccionado de la clase que consiste en aldehído glutánico, halogenuro cianúrico, y combinaciones de los mismos, y (2) un polímero catiónico, soluble en agua, obtenido por polimerización de una epihalohidrina con una alcoholenpoliamina que tiene la fórmula $R_1R_2NRNH_2$, donde R es un alcoholeno inferior que tiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y R_1 y R_2 son, cada uno de ellos, un alcoholeno inferior de entre 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono, siendo la relación molar de epihalohidrina a poliamina desde aproximadamente 0,60:1 hasta aproximadamente 2,7:1, comprendiendo dicha polimerización hacer reaccionar con la alcoholenpoliamina, desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 90% de la cantidad de epihalohidrina que ha de ser polimerizada, dejar continuar la reacción hasta que el medio de reacción alcanza una viscosidad sustancialmente uniforme, y hacer reaccionar la porción restante de la epihalohidrina, por incrementos, para obtener el polímero catiónico, siendo la temperatura de polimerización entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 120°C, y recuperar el agregado re-

sultante.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el componente (1) del producto de reacción de reticulación es aldehído glutárico.

5 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el componente (1) del producto de reacción de reticulación es halogenuro cianúrico.

10 4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el componente (1) del producto de reacción de reticulación es una combinación de aldehído glutárico y halogenuro cianúrico.

15 5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual las células bacterianas se ponen en contacto con el producto de reacción de reticulación a un pH de aproximadamente 8 a 9 y a una temperatura de aproximadamente 0 a 30°C, durante aproximadamente 0,5 a 1,5 horas.

20 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual las células bacterianas se ponen en contacto con entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 60% en peso del producto de reacción de reticulación, basado en el peso en seco de las células.

25 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el producto de reticulación resulta de la reacción de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 77% en peso de componente (1) y entre aproximadamente 23 y aproximadamente 88% en peso de componente (2), basado en el peso total de los ingredientes activos de los componentes (1) y (2).

30 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el cual el componente (1) del producto de reac-

ción de reticulación, contiene entre aproximadamente 0 y -
aproximadamente 77% en peso de aldehído glutárico y entre
aproximadamente 0 y aproximadamente 22% en peso de haloge-
nuro cianúrico, y en el que la cantidad total de aldehído
5 glutárico y/o halogenuro cianúrico está comprendida entre
aproximadamente 12 y aproximadamente 77% en peso, estando
dichos porcentajes en peso basados en el peso total de los
ingredientes activos de los componentes (1) y (2).

9^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindica-
10 ción 1^a, en el cual las células bacterianas son Streptomyces
olivaceus.

10^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1^a, en el cual el halogenuro cianúrico es triclóru-
ro cianúrico.

15 11^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1^a, en el cual el producto de reticulación resulta -
de la reacción de 57,1% en peso de aldehído glutárico como
componente (1) y 42,9% en peso de componente (2), basado en
el peso total de los ingredientes activos de los componen-
20 tes (1) y (2), y dicho producto de reacción de reticulación
se utiliza en una cantidad de 17,5% en peso, basado en el -
peso en seco de las células bacterianas.

12^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1^a, en el cual el producto de reticulación resulta -
25 de la reacción de 54,9% en peso de aldehído glutárico y 3,6%
en peso de triclóru-
ro cianúrico como componente (1) y 41,5%
en peso de componente (2), basado en el peso total de los -
ingredientes activos de los componentes (1) y (2), y dicho
producto de reacción de reticulación se utiliza en una can-
30 tidad de 18,2% en peso basado en el peso en seco de las cé-

lulas bacterianas.

5 13ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivin-
dicación 1ª, en el cual el producto de reacción de reticu-
lación se obtiene haciendo reaccionar los componentes (1)
y (2) a un pH de aproximadamente 6 a 10 y a una temperatu-
ra de aproximadamente 0 a 30°C, durante aproximadamente -
0,5 a 2,5 horas.

10 14ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivin-
dicación 1ª, en el cual el agregado recubierto se seca se-
guidamente.

15 15ª.- Un procedimiento para obtener un agregado
de células bacterianas.

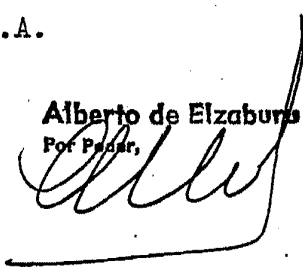
Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-
tecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 22.AGO.1979

P.A.

20 **Alberto de Elizaburu**
Por Pasar,



25

30