

ANTECEDENTES 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 nutrientes apropiados. La glucosa-isomerasa se forma en el interior de las células bacterianas que se desarrollan durante su producción. Las células pueden separarse por filtración a partir del caldo de fermentación y se pueden utilizar directamente como una fuente de glucosa-isomerasa. El empleo comercial directo de tales células bacterianas que contienen la enzima se ha visto dificultado, sin embargo, por una desventaja importante. Las células perdían la actividad enzimática durante su uso y así se acortaba la vida útil de las células. Esta desventaja se superó por el tratamiento de las células bacterianas con aldehído glutárico como se describe en la Patente de EE.UU. N° 3.779.869. Técnicas adicionales para inmovilizar la actividad enzimática en las células bacterianas así como para formar agregados de tales células bacterianas que contienen enzima se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 3.821.086 y sus Patentes de Reexpedición de EE.UU. Núms. 29.130 y 29.136, así como en la Patente de Africa del Sur N° 73/5917. Las Patentes de EE.UU. anteriores se refieren al uso de ciertos agentes de floculación polielectrolíticos aniónicos y catiónicos. La Patente de Africa del Sur describe diversas combinaciones de aglutinantes, agentes reforzadores y agentes de reti-

culación. Si bien las técnicas anteriores proporcionaban -
agregados de células bacterianas que generalmente retenían
su actividad enzimática durante su empleo, existía todavía
la necesidad de acrecentar la solidez de los agregados a -
5 fin de que pudieran utilizarse comercialmente en lechos de
reactor de altura creciente. La Patente de EE.UU. N° 3.935.069
describe la adición de ciertos compuestos metálicos en con-
junción con agentes floculantes polielectrolíticos para me-
jorar la solidez. Sin embargo, esta técnica tiene una utili-
10 dad limitada.

Un desarrollo adicional para mejorar la solidez
de los agregados de células bacterianas se describe en la
Solicitud de Patente española N° 478.940, presentada el 26
de marzo de 1979. En la Solicitud 478.940, la masa de célu-
15 las bacterianas que tiene una actividad enzimática deseada
se trata con un producto de reacción de reticulación de (1)
aldehído glutárico, haluro cianúrico o combinaciones de los
mismos y (2) un polímero catiónico soluble en agua obtenido
por polimerización de una epihalohidrina con una poli(alco-
20 hilen-amina) y se recupera luego el agregado resultante. -
Los agregados resultantes pueden extraerse o conformarse de
otro modo para formar agregados conformados de solidez mejo-
rada. Sin embargo, cuando se utilizan tales productos con-
formados en una columna para conducir procedimientos enzimá-
25 ticos, es deseable una solidez adicional para reducir las -
pérdidas por compactación.

En la fabricación de agregados celulares bacteria-
nos conformados, se produce una cierta cantidad de producto
finamente dividido que tiene tamaños de partícula demasiado
30 pequeños para uso comercial. Se han propuesto diversas téc-

nicas para la utilización de estos finos. La Patente de EE.UU. N° 4.060.456 describe la recirculación de finos de producto a un depósito de floculación en el que se emplea un agente floculante para formar agregados de células bacterianas. Si bien esta descripción proporciona un uso para finos recirculados en la producción de un agregado floculado, no hay indicación alguna sobre si se observa efecto alguno en la solidez del producto. El uso de soportes de enzima recirculada se describe en las Patentes de EE.UU. 4.002.576; 4.078.970 y 4.087.330, pero en ningún caso se hace descripción o sugestión alguna de que tales materiales recirculados puedan contribuir a mejorar la solidez del producto conformado.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para mejorar la solidez de un agregado celular bacteriano que comprende añadir un agregado celular bacteriano finamente dividido y seco previamente producido a un agregado celular bacteriano subsiguientemente a su formación pero antes de su conformación. Esta invención es especialmente útil cuando el agregado resultante se seca y luego se rehidrata para su utilización subsiguiente.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

El procedimiento de la presente invención puede utilizarse con diversas células bacterianas que contienen enzimas. El resto de la descripción se dedicará a la utilización del procedimiento con células bacterianas que contienen actividad de glucosa-isomerasa.

Las células bacterianas que contienen actividad de glucosa-isomerasa útiles en el procedimiento de la pre-

sente invención pueden producirse por procedimientos bien conocidos. Las células preferidas que contienen enzima se producen por desarrollo en condiciones aerobias sumergidas de un cultivo de Streptomyces olivaceus NRRL 3583 o mutan-

5 tes del mismo en un medio que contiene nutrientes apropiados. Esto se describe en la Patente de EE.UU. N° 3.625.828. Las células bacterianas resultantes se separan del caldo de fermentación por filtración o centrifugación.

Los agregados de células bacterianas utilizados

10 como materiales de partida en el procedimiento de la presente invención pueden producirse por diversas técnicas bien conocidas. Tales agregados se obtienen preferiblemente por tratamiento de las células bacterianas arriba indicadas con

15 aldehído glutárico de acuerdo con el procedimiento indicado en la Patente de EE.UU. N° 3.779.869. Los agregados celulares bacterianos más preferidos se obtienen por tratamiento de las células bacterianas arriba indicadas con un producto de reacción de reticulación de (1) aldehído glutárico, halu-

20 ro cianúrico o combinaciones de los mismos y (2) un polímero catiónico soluble en agua obtenido por la polimerización de una epihalohidrina con una poli(alcoholen-amina). Este procedimiento se describe en la Solicitud de Patente española N° 478.940, presentada el 26 de marzo de 1979. La des-

25 cripción que sigue se refiere a la producción de agregados celulares bacterianos empleando el procedimiento de la Solicitud de Patente española 478.940, arriba indicada.

Los ingredientes empleados en el procedimiento de agregación son fácilmente asequibles. El aldehído glutárico y el haluro cianúrico, tal como tricloruro cianúrico, tri-

30 bromuro cianúrico, triyoduro cianúrico y análogos, son co--

5
10
15
20
25
30

mercialmente asequibles o pueden producirse por técnicas bien conocidas. El polímero de epihalohidrina-poliamina particular utilizado en este procedimiento de agregación es comercialmente asequible bajo la marca comercial BETZ 1180 de Betz Laboratories, Inc., Trevose, Pensilvania. BETZ 1180 tiene un peso molecular menor que un millón, contiene aproximadamente 0,288 milimoles de grupos amino por gramo de solución (basado en un ensayo con ninhidrina) y se encuentra en el mercado en forma de una solución que contiene 30 por ciento en peso de sólidos, basado en el peso total de la solución. Este compuesto se describe en la Patente de EE.UU. N° 3.915.904. El compuesto se describe en dicha memoria como un polímero catiónico soluble en agua obtenido por la polimerización de una epihalohidrina con una poli(alcoholen--amina) que tiene la fórmula $R_1R_2NRNH_2$ en la que R es un alcoholeno inferior que tiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y R_1 y R_2 son cada uno un alcoholo inferior que tiene desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, siendo la relación molar de epihalohidrina a poli-
mina desde aproximadamente 0,60:1 a aproximadamente 2,7:1, comprendiendo dicha polimerización hacer reaccionar con la poli(alcoholen-amina) desde aproximadamente 50 a aproximadamente 90 por ciento de la cantidad de epihalohidrina a polimerizar, dejar que continúe la reacción hasta que el medio de reacción alcanza una viscosidad sustancialmente uniforme, y hacer reaccionar la porción restante de la epihalohidrina incrementalmente para obtener el polímero catiónico, siendo la temperatura de polimerización de aproximadamente 60°C a aproximadamente 120°C. De aquí en adelante, se hará referencia a este material como el "polímero de poliamina".

El producto de la reacción de reticulación emplea
do para formar el agregado de células bacterianas puede ser
una de las tres composiciones posibles. El polímero de poli
amina puede hacerse reaccionar con aldehído glutárico o ha
luro cianúrico o con aldehído glutárico y haluro cianúrico
5 al mismo tiempo.

El aldehído glutárico y/o haluro cianúrico, que -
se identifica colectivamente como componente (1), se hace -
reaccionar con el polímero de poliamina, que se identifica
10 como componente (2), a un pH de aproximadamente 6 a 10 y a
aproximadamente 0° a 30°C durante aproximadamente 0,5 a 2,5
horas. El producto de la reacción de reticulación global -
contiene desde aproximadamente 12 a aproximadamente 77 por
ciento en peso de componente (1) y desde aproximadamente 23
15 a aproximadamente 88 por ciento en peso de componente (2) -
basado en el peso total de los ingredientes activos en los
componentes (1) y (2). El contenido de aldehído glutárico -
en el producto de reacción es de aproximadamente 0 a aproxi
madamente 77 por ciento en peso y el contenido de haluro -
20 cianúrico es de aproximadamente 0 a aproximadamente 22 por
ciento 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 polí
mero de poliamina se lleva a cabo preferiblemente a un pH -
25 de 8 a 9 y a aproximadamente 18° a 25°C durante aproximada
mente 0,5 horas. El aldehído glutárico debe estar presente
en una relación molar de al menos un mol por mol de grupo -
amino en el polímero de poliamina a fin de evitar una reti
culación indeseable del polímero de poliamina con el aldehí
do glutárico.
30

La reacción entre el haluro cianúrico solo y el polímero de poliamina se lleva a cabo preferiblemente a un pH de 8 a 9 y a 0° a 10°C durante aproximadamente 1 a 2 horas. El haluro cianúrico debe estar presente en una relación molar de al menos un mol por mol de grupo amino en el polímero de poliamina a fin de evitar una reticulación indeseable del polímero de poliamina con el haluro cianúrico. El haluro cianúrico, tal como tricloruro cianúrico, tiene tres puntos de halógeno reactivos. Uno de estos puntos reaccionará a 0°C o temperaturas superiores. Después de la reacción en el primer punto, el segundo punto reaccionará a 30°-50°C, y el punto final reaccionará entre 90° y 100°C. Es deseable hacer reaccionar inicialmente solo el primer punto del haluro cianúrico con el polímero de poliamina. Cuando el producto de la reacción de reticulación resultante se hace reaccionar subsiguientemente con las células bacterianas y se calienta a temperaturas más altas durante el secado, los puntos reactivos restantes del haluro cianúrico reaccionarán después 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 haluro cianúrico se lleva a cabo por etapas. Primeramente, el haluro cianúrico se hace reaccionar con el polímero de poliamina a un pH de 8 a 9 y a temperatura de 0° a 10°C durante aproximadamente 1 a 2 horas. Preferiblemente, en esta situación las sustancias reaccionantes tienen una relación molar de un mol de haluro cianúrico a dos moles de grupos amino en el polímero de poliamina. Se añade entonces una cantidad en exceso de aldehído

do glutárico y se continúa la reacción en las mismas condiciones de pH y temperatura durante aproximadamente 0,5 horas

5 El producto de la reacción de reticulación empleado en la producción del agregado celular bacteriano preferido no es un polielectrolito catiónico, dado que los grupos amino existentes en el polímero de poliamina que proporcionaban inicialmente la característica catiónica han reaccionado con el aldehído glutárico y/o haluro cianúrico y por
10 tanto ya no están disponibles.

Los agregados celulares bacterianos se preparan poniendo en contacto una masa de células bacterianas con el producto de la reacción de reticulación preparado como se describe arriba a un pH de aproximadamente 8 a 9 y una temperatura de aproximadamente 0° a 30°C durante aproximadamente
15 0,5 a 1,5 horas. El producto de la reacción de reticulación se emplea en tal cantidad y concentración que las células bacterianas están en contacto con una proporción comprendida entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 60 por
20 ciento en peso de los ingredientes activos del producto de reacción de reticulación basado en el peso seco de las células.

Después que tiene lugar la reacción anterior, la suspensión de agregado celular bacteriano resultante se pone convenientemente en un depósito de retención o de compensación aguas arriba del aparato de filtración, tal como un
25 filtro rotativo de vacío. La suspensión se filtra luego para producir una torta de filtración constituida por agregado celular bacteriano húmedo. Este agregado celular bacteriano húmedo se extruye después o se conforma de otro modo
30

en formas deseadas, secándose luego a aproximadamente 60°C durante varias horas.

El agregado seco arriba producido se muele y se tamiza para producir partículas del agregado deseado que tienen un tamaño tal que pasen a través de un tamiz de 1,19 mm y queden retenidas sobre un tamiz de 707 micras (dimensiones de tamices de los EE.UU.). El material producido que tiene un tamaño de partícula mayor que 1,19 mm se muele nuevamente, mientras que el material producido que tiene un tamaño de partícula menor que aproximadamente 707 micras y un contenido de humedad de aproximadamente 12 por ciento en peso se recircula de acuerdo con la presente invención.

El agregado celular bacteriano finamente dividido y secado producido previamente o los finos que pasan a través del tamiz de 707 micras se añaden al agregado celular bacteriano subsiguientemente a su formación pero antes de su conformación, tal como por extrusión. Esto puede hacerse convenientemente de dos maneras por lo menos. En un procedimiento, los finos se pueden mezclar con la suspensión de agregado celular bacteriano en el depósito de retención o de equilibrio aguas arriba del filtro. En otro procedimiento, los finos se pueden mezclar con el agregado celular bacteriano húmedo antes de la entrada del mismo en el extrusor.

El agregado celular bacteriano finamente dividido y secado se añade al agregado celular bacteriano en una cantidad de hasta aproximadamente 70 por ciento en peso basado en el peso total de los sólidos de la mezcla. Preferiblemente, los finos se añaden al agregado celular bacteriano en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 por ciento en peso basada en el peso total de los sólidos de la

mezcla. De un modo muy preferible, los finos se añaden en una cantidad de aproximadamente 30 por ciento en peso basada en el peso total de los sólidos de la mezcla.

5 La mezcla de finos y agregado celular bacteriano húmedo se conforma, preferiblemente por extrusión de tal mezcla a través de una matriz de área de sección transversal reducida, se seca la mezcla conformada o producto extruido y el agregado seco se muele y se separa para producir el intervalo de tamaños de partícula deseado. Cualesquiera finos producidos pueden recircularse de acuerdo con esta invención. Actualmente se prefiere una matriz de extrusión que tenga aberturas de aproximadamente 3,18 mm a aproximadamente 1,59 mm.

15 El agregado seco resultante puede almacenarse hasta que se necesite subsiguientemente para su empleo en un procedimiento enzimático. En ese momento, el agregado seco se rehidrata y se acondiciona así para ser utilizado. Un procedimiento de acondicionamiento ilustrativo se describe en la Patente de EE.UU. N° 3.974.036.

20 Una ventaja principal de la presente invención es un aumento en la solidez del agregado celular bacteriano después de la rehidratación en comparación con los agregados celulares bacterianos de la técnica anterior. La solidez se expresa en relación con la resistencia a la compresión de las partículas del agregado celular bacteriano. Se empleó un aparato Instron Universal Tester Model 1102 de un modo similar al descrito en la Patente de EE.UU. N° 3.935.069. Este instrumento puede adquirirse a Instron Corporation, Canton, Massachusetts.

30 La carga o cubeta de ensayo empleada con el Instron

5 Tester arriba indicado se compone de un cilindro de plástico acrílico transparente que tiene un diámetro interior de 4,37 cm, un diámetro exterior de 6,45 cm y una altura de 21,8 cm. La porción del fondo tiene un diente de 0,635 cm de grueso con una abertura de 3,81 cm que forma un soporte para un microfiltro. Un microfiltro conveniente es una hiler_u empleada en el hilado de fibras textiles que tiene 14500 aberturas de aproximadamente 0,2032 mm de diámetro.

10 Se monta un émbolo de acero inoxidable Tipo 304 de 4,3 cm de diámetro y 13,66 cm de longitud de tal modo que se mueva coaxialmente en el interior del cilindro arriba indicado. Se establecen indicaciones apropiadas a lo largo de la cubeta de carga para mostrar una altura de muestra de 10,17 cm. Se hacen también provisiones para aplicar una
15 presión reducida o vacío al fondo de la cubeta de carga y para recoger cualquier líquido que pase a través del microfiltro.

20 Si se pone una muestra de agregado celular bacteriano en la cubeta de carga arriba citada y se aplica presión a la muestra mediante el émbolo, la muestra se comprimirá. La presión necesaria para comprimir la muestra en una cuantía dada es una indicación de la solidez de la muestra.

25 Lo que sigue es el Procedimiento de Ensayo de solidez a la rehidratación empleado en los ejemplos de esta memoria descriptiva:

30 Una solución acuosa de glucosa al 33 por ciento en peso se ajusta a pH 8,1. Una porción de 130 g de agregado celular bacteriano seco se mezcla con 1300 ml de tal solución de glucosa con agitación suave a 24°C durante una hora. La mezcla resultante se escurre sobre un tamiz de 841 micras

(calibre de tamices de los EE.UU.) durante aproximadamente 30 segundos. Los sólidos se resuspenden luego en una porción de nueva aportación de la solución de glucosa anterior y se agitan durante 5 minutos a 24°C. La suspensión resultante se deja sedimentar durante 5 minutos y luego se escurre como anteriormente. Los sólidos se resuspenden después en una porción de nueva aportación de la solución de glucosa anterior y se agitan durante 5 minutos a 24°C. Aproximadamente la mitad de la suspensión resultante se vierte después en la cubeta de ensayo hasta alcanzar una altura de 10,17 cm. Se aplica al fondo de la cubeta de ensayo durante 3 minutos una presión reducida o vacío de 2,54 cm de mercurio para aspirar el líquido a través del microfiltro. El émbolo se hace bajar luego hasta que toca exactamente el extremo superior de la muestra. Se fija el cabezal del instrumento Instron al émbolo y se ajusta para desplazarse hacia abajo a una velocidad de 1,27 cm/min y para detenerse una vez alcanzada una penetración de 2,54 cm. Se ajusta la velocidad del gráfico registrador a 12,7 cm/min. Al final de la penetración, se deja que se recupere el émbolo durante exactamente 1 minuto. Se pone de nuevo el émbolo en contacto con el extremo superior de la muestra y se ajusta el Instron para detenerse a una penetración de 2,54 cm. La presión necesaria para alcanzar la segunda penetración es la medida de la resistencia de la muestra.

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

EJEMPLO 1

Se preparó una solución de polímero de poliamina por dilución de 1750 g de solución de BETZ 1180 que contenía

525 g de material activo con agua destilada para formar 15 litros. Se ajustó el pH a 9. Se preparó una solución de aldehído glutárico por dilución de 2670 ml de aldehído glutárico al 25 por ciento en peso que contenía 667 g de material activo con agua destilada para formar 15 litros. Se ajustó el pH a 9. Se mezclaron luego estas dos soluciones y se añadió agua destilada para formar un total de 42 litros. La reacción tuvo lugar a un pH de aproximadamente 9 y una temperatura de aproximadamente 25°C durante aproximadamente media hora. El producto resultante se formó a partir de una mezcla de reacción que contenía 56 por ciento en peso de aldehído glutárico y 44 por ciento en peso de polímero de poliamina basado en el peso total del aldehído glutárico (Componente 1) y el polímero de poliamina (Componente 2).

Un cultivo de un mutante de Streptomyces olivaceus NRRL 3583 se desarrolló en un fermentador aireado agitado que contenía un medio nutriente apropiado descrito en la Patente de EE.UU. N° 3.625.828. El caldo de fermentación resultante que contenía una masa de células bacterianas se ajustó a pH 8-9 por adición de materiales tampón apropiados. Se añadió al caldo del fermentador la solución arriba preparada en una cantidad de 6 ml por gramo de peso de células secas para proporcionar 17 por ciento en peso de producto de reacción total basado en el peso seco de las células bacterianas.

Después de aproximadamente 30 minutos de tiempo de reacción a 25°C y a un pH de 8-9, el caldo tratado que contenía el agregado celular bacteriano se puso en un depósito de retención desde el cual se hizo pasar luego a un filtro rotativo de vacío. La torta de filtración húmeda resultante se cortó en pequeños trozos de aproximadamente 1 cm² en una máquina

cortadora de tacos. Los trozos de torta de filtración húmedos cortados que tenían un contenido de humedad de aproximadamente 76 por ciento en peso se dividieron después en cuatro porciones. Una porción se extruyó luego a través de una matriz que tenía seis aberturas de 3,18 mm de diámetro utilizando un tornillo extrusor sin compresión con una rotación de tornillo de 100 RPM. Luego se secó el agregado celular bacteriano extruido resultante a 60°C durante 4 a 6 horas y se molió. Las partículas molidas se separaron luego para recoger la fracción deseada que pasa a través de un tamiz de 1,19 mm de abertura de mallas pero que es retenida por un tamiz de 707 micras de abertura. Se recogieron los finos que pasaban por el tamiz de 707 micras para uso posterior. La fracción -1,19 mm +707 micras se designó como el "Testigo". Su actividad de glucosa-isomerasa se midió por el método de ensayo recogido en la Patente de EE.UU. Nº 3.779.869 y era 430 unidades de glucosa-isomerasa (U.G.I.) por gramo. Su solidez se midió también por el procedimiento de ensayo de solidez a la rehidratación antes descrito.

Las tres porciones restantes de torta de filtración del agregado celular bacteriano húmedo se mezclaron luego individualmente en un mezclador con cantidades controladas de agregado celular bacteriano de Streptomyces olivaceus seco preparado previamente que tenía un tamaño de partículas menor que aproximadamente 707 micras y que tenía un contenido de humedad de 12 por ciento en peso. Cada una de las tres porciones mezcladas (Muestras 1B, 1C y 1D) se extruyeron, secaron y molieron individualmente y se separaron como se ha descrito antes para la muestra Testigo produciendo porciones de agregado celular bacteriano que tenía tama-

ños de partículas que pasan a través de un tamiz de 1,19 mm de abertura y son retenidas en un tamiz de 707 micras de abertura. Se obtuvieron luego la solidez y actividad enzimática de cada porción de producto. Los resultados se muestran en la Tabla I siguiente.

5

La solidez de las muestras se expresa como un aumento del porcentaje respecto a la solidez del Testigo.

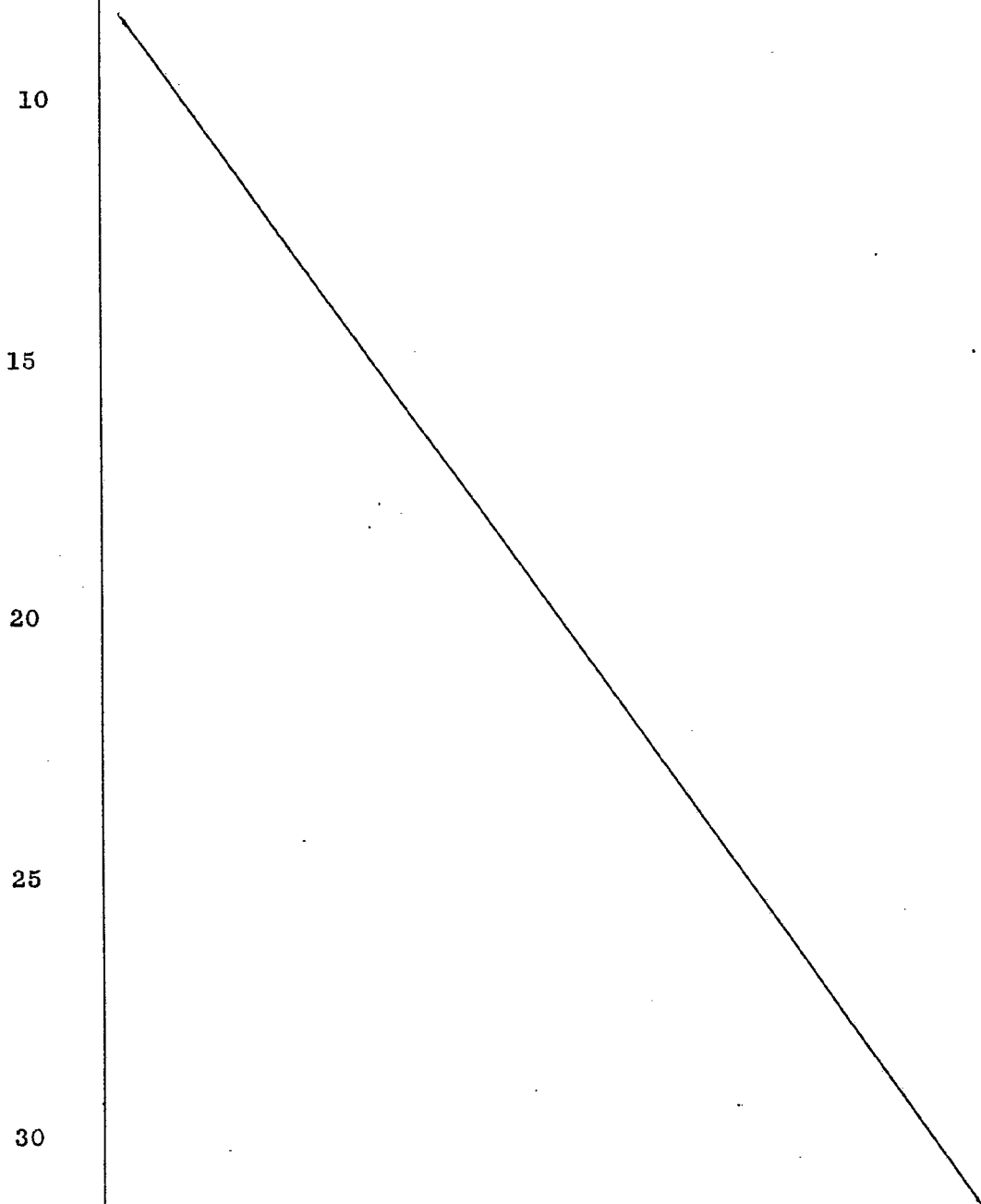


TABLA I

<u>Muestra</u>	<u>Contenido de humedad global</u>	<u>Porcentaje en peso</u>	<u>Finos re- circulados</u>	<u>Torta de filtración</u>	<u>Porcentaje en peso basado en sólidos totales</u>	<u>Porcentaje de solidez creciente</u>	<u>Actividad U.G.I./g</u>
1A (Testigo)	76,0		0	100	-		430
1B	69,5		28,1	71,9	42,46		459
1C	56,5		60,1	39,9	49,01		433
1D	43,5		77,9	22,1	133,15		231

La reducción en la actividad enzimática para la muestra 1D se cree que es debido a la inactivación originada por la temperatura y presión creadas elevadas en el extrusor por el contenido de humedad inferior. Parece que puede emplearse una adición de finos de hasta aproximadamente 70 por ciento en peso basado en los sólidos totales sin perjudicar su actividad enzimática.

EJEMPLO 2

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1 con los cambios siguientes. Tres porciones de torta de filtración húmeda se mezclaron individualmente con 46,8 por ciento en peso de finos del agregado celular bacteriano recirculado basados en los sólidos totales. Estas tres porciones se extruyeron separadamente a través de matrices que tenían seis aberturas de 3,18 mm de diámetro, ocho aberturas de 1,59 mm de diámetro y diez aberturas de 1,19 mm de diámetro. Los resultados se muestran en la Tabla II siguiente.

20

25

30

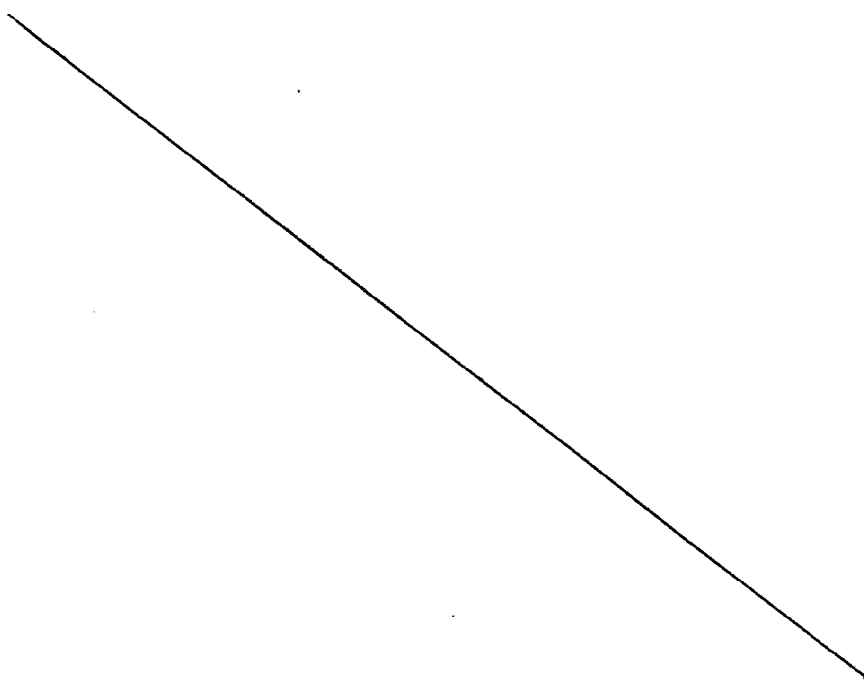


TABLA II

<u>Muestra</u>	<u>Contenido de humedad</u>	<u>Porcentaje en peso basado en sólidos totales</u>	<u>Finos re- circulados</u>	<u>Torta de filtración</u>	<u>Diámetro de la matriz</u>	<u>Porcentaje de solidez creciente</u>	<u>Actividad U.G.I./g</u>
	<u>Porcentaje en peso</u>				<u>Milímetros</u>		
2A (Testigo)	80,32	0	100	3,18	-	576	
2B	73,87	46,8	53,2	3,18	36,22	542	
2C	73,87	46,8	53,2	1,59	53,58	557	
2D	73,87	46,8	53,2	1,19	14,82	533	

El diámetro de matriz preferido de 3,18 mm a 1,59 mm proporciona un aumento alto deseable en la solidez sin pérdida correspondiente de actividad.

EJEMPLO 3

5 Se repitió el procedimiento del Ejemplo I con los siguientes cambios. Se mezclaron individualmente tres porciones de la torta de filtración húmeda con 60,1 por ciento en peso de finos del agregado celular bacteriano recirculado basado en los sólidos totales. Las cuatro porciones se
10 extruyeron luego a través de ocho aberturas de 1,59 mm de diámetro. La parte Testigo (Muestra 3A) se extruyó empleando un tornillo sin compresión que giraba a 60 RPM. Una primera porción (Muestra 3B) mezclada con los finos se extruyó en las mismas condiciones que la Testigo. Una segunda
15 porción (Muestra 3C) mezclada con los finos se extruyó empleando un tornillo de compresión 3:1 de un solo paso a 40 RPM. Una tercera porción (Muestra 3D) mezclada con los finos se extruyó empleando un tornillo de compresión 3:1 de
20 doble paso a 30 RPM. Los resultados se muestran en la Tabla III siguiente.

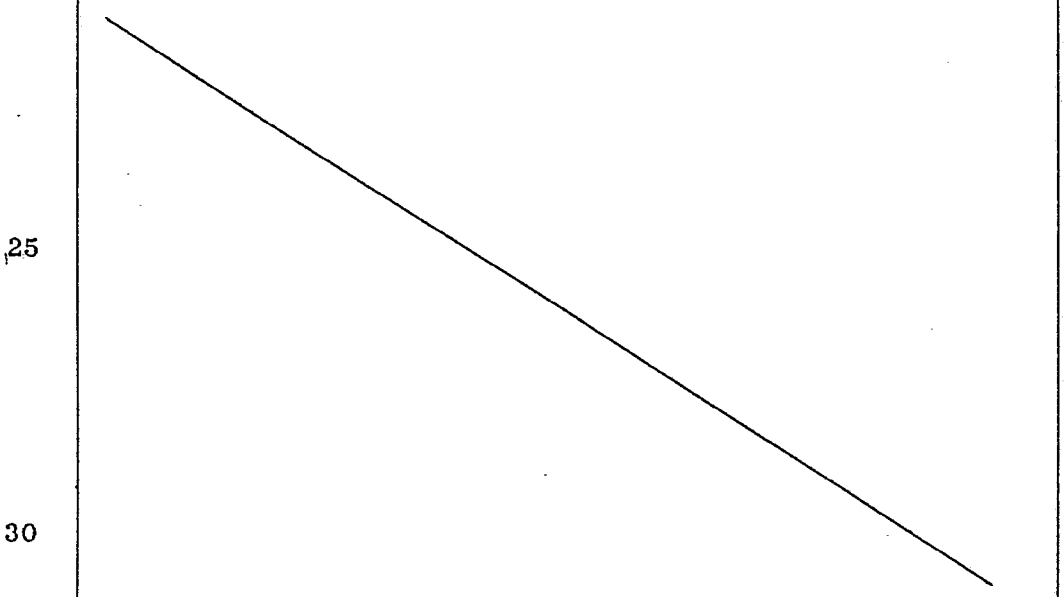


TABLA III

<u>Muestra</u>	<u>Contenido de</u> <u>humedad</u>	<u>Porcentaje en peso</u> <u>basado en sólidos</u>		<u>Actividad</u> <u>U.G.I./g.</u>
	<u>Porcentaje</u> <u>en peso</u>	<u>Finos re-</u> <u>circulados</u>	<u>Torta de</u> <u>filtración</u>	
3A (Testigo)	78,30	0	100	650
3B	58,11	60,1	39,9	506
3C	58,11	60,1	39,9	517
3D	58,11	60,1	39,9	484

Todas las muestras que empleaban finos recirculados tenían aumentos deseables en la solidez manteniendo niveles aceptables de actividad.

EJEMPLO 4

5 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1 con los cambios siguientes. Una porción (Muestra 4B) de la torta de filtración húmeda se mezcló con 46,8 por ciento en peso de finos de agregado celular bacteriano recirculado basados en los sólidos totales. Otra porción (Muestra 4C) se secó a -
10 60°C durante 10 minutos antes de la extrusión. Otra porción (Muestra 4D) se secó a 60°C durante 20 minutos antes de la extrusión. Todavía se secó otra porción (Muestra 4E) a 60°C durante 30 minutos antes de la extrusión. Una porción final (Muestra 4F) se secó a 60°C durante 40 minutos antes de la
15 extrusión. La porción Testigo no tratada (Muestra 4A) y las otras porciones tratadas se extruyeron todas a través de - ocho aberturas de 1,59 mm de diámetro empleando un tornillo sin compresión a 80 RPM. Los resultados se muestran en la -
20 Tabla IV siguiente.

20

25

30

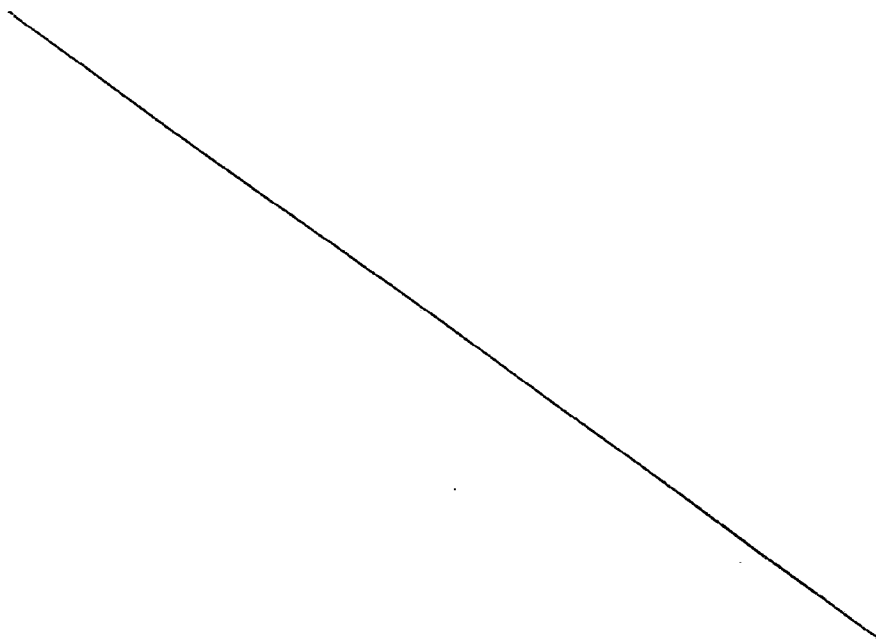


TABLA IV

<u>Muestra</u>	<u>Contenido de</u> <u>humedad</u>	<u>Porcentaje en peso</u> <u>basado en sólidos</u>		<u>Porcentaje de</u> <u>solidez creciente</u>	<u>Actividad</u> <u>U.G.I./g</u>
	<u>Porcentaje</u> <u>en peso</u>	<u>Finos re-</u> <u>circulados</u>	<u>Torta de</u> <u>filtración</u>		
4A (Testigo)	74,36	0	100	-	440
4B	61,69	46,8	53,2	58,14	440
4C	68,90	0	100	-21,65	446
4D	67,20	0	100	2,29	465
4E	65,10	0	100	9,22	471
4F	57,00	0	100	18,37	452

dicó por el empleo de este nuevo procedimiento.

5

10

15

20

25

30

1

REIVINDICACIONES

5

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:

10

1ª.- Un procedimiento para mejorar la solidez de un agregado celular bacteriano conformado de Streptomyces olivaceus, que comprende añadir un agregado celular bacteriano de Streptomyces olivaceus finamente dividido y seco, previamente producido, que tiene un tamaño de partículas inferior a aproximadamente 707 micras (25 mallas), a un agregado celular bacteriano de Streptomyces olivaceus - después de su formación, pero antes de su conformación, añadiéndose dicho agregado celular bacteriano finamente dividido y seco en una cantidad de hasta aproximadamente 70% en peso, basado en el peso total de los sólidos de la mezcla.

15

20

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el agregado celular bacteriano - finamente dividido y seco se añade al agregado celular bacteriano en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 por ciento en peso basado en el peso total de los sólidos de la mezcla.

25

30

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el agregado celular bacteriano - finamente dividido y seco se añade al agregado celular bacteriano en una cantidad de aproximadamente 30 por ciento en

1 - peso basado en el peso total de los sólidos de la mezcla.

4ª.- Un procedimiento para mejorar la solidez de un agregado celular bacteriano conformado de Streptomyces olivaceus.

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

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

MADRID, 01. FEB. 1980

P.A.

Alberto de Elizaburu
Per Poder,



300180

CGD.