

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

ES	11	NUMERO	480217	10	AI
	21				
	22	FECHA DE PRESENTACION	4-5-79		

PATENTE DE INVENCION

20	PRIORIDADES:	22	FECHA	23	PAIS
	31	NUMERO			
		Sho-53-45691	12-5-78		Japón

47	FECHA DE PUBLICIDAD	61	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07G 7/02		

54	TITULO DE LA INVENCION
	"UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UNA ENZIMA INMOVILIZADA"

71	SOLICITANTE (S)	(Case No. 3211)
	CPC INTERNATIONAL INC.	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
International Plaza, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 07632, Estados Unidos de América.	

72	INVENTOR (ES)
	SOICHIRO USHIRO

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE	(P.- 71.441)
	DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ	

CADUCADO

1 La presente invención se refiere a un método
para preparar composiciones de enzimas inmovilizadas. Es-
tas composiciones se preparan a partir de microorganismos
que producen a ambos la enzima y el polisacárido inhibidor
5 de adsorción. Se obtiene una preparación de enzima cruda
a partir del cultivo del microorganismo, se elimina el po-
lisacárido de la preparación enzimática y luego la prepa-
ración de la enzima purificada resultante se pone en con-
tacto con un portador adsorptivo para inmovilizar la enzima.

10 En años recientes se ha puesto gran énfasis en
el desarrollo y la aplicación industrial de procedimientos
que involucran el uso de enzimas inmovilizadas. La enzima
inmovilizada se produce generalmente poniendo en contacto
una preparación enzimática (ya sea una solución cruda o
15 purificada de la enzima) con un portador adsorptivo para la
misma. Estas enzimas inmovilizadas son particularmente úti-
les porque facilitan el procesamiento continuo en oposición
al procesamiento en tandas.

Al tratar de adaptar las varias enzimas para el
20 uso de enzima inmovilizada, sin embargo, han surgido cier-
tos problemas tales como los bajos niveles de absorción en
el portador. Este problema es particularmente indeseable
porque da como resultado composiciones de enzimas inmovi-
lizadas que tienen bajas eficiencias de operación.

25 La presente invención involucra, en parte, el
descubrimiento de una causa principal y de medios para su-
perar el problema que antecede. Por consecuencia, esta in-
vención permite el uso de muchas enzimas que hasta ahora
no se han llevado a la práctica con éxito en forma inmovi-
30 lizada.

1 Las dificultades que se han hallado en lo que
antecede en la inmovilización de ciertas enzimas han demos-
trado que derivan de la presencia de ciertos polisacáridos
de elevado peso molecular que están comúnmente presentes
5 en las preparaciones enzimáticas. Estos polisacáridos son
también adsorbidos por los portadores y han demostrado que
inhiben la adsorción de la enzima, presumiblemente a tra-
vés del bloqueo de los lugares activos en un portador que
normalmente atraerían y mantendrían la enzima.

10 La presente invención comprende un método para
la producción de enzima inmovilizada que comprende:

(a) obtener una preparación enzimática que con-
tiene un polisacárido inhibidor de adsorción;

15 (b) separar el polisacárido de la preparación en-
zimática; y

(c) poner en contacto la solución de enzima re-
sultante con un portador adsorbtivo para inmovilizar la en-
zima.

20 Esta invención proporciona un método para obtener
fácilmente una enzima inmovilizada de elevada actividad y
con la cual es posible llevar a cabo reacciones continuas
con eficiencias aumentadas.

25 La figura ilustra el modelo de elución para la
glucosa isomerasa y el polisacárido tal como se describe
en el ejemplo experimental 2.

En dicha Figura en el eje vertical izquierdo:
x—x = hidrato de carbono; —○ = densidad óptica a 280
m μ y ○—○ actividad de glucosa-isomerasa. En el eje
vertical derecho se representa la concentración de NaCl en
30 moles.

1 En el eje horizontal debe leerse cromatografía
en columna de DEAF - celulosa de solución S de glucosa - iso-
merasa.

5 Aunque no todas las preparaciones enzimáticas con-
tienen suficiente polisacárido para evidenciar interferen-
cia substancial con la adsorción de enzimas e inmoviliza-
ción en un portador, hay muchas otras que sí. En particu-
lar, aquellos microorganismos que producen y retienen enzi-
mas substancialmente intracelulares son un problema. Para
10 obtener una preparación enzimática a partir de la misma,
es necesario efectuar la ruptura de la célula para liberar
la enzima. Esta ruptura ha demostrado contribuir de manera
significativa a la cantidad de polisacárido inhibidor de
adsorción que estará presente en una preparación enzimáti-
ca resultante.
15

 Se ha descubierto también que las preparaciones
de ciertos tipos de enzimas parecen evidenciar concentra-
ciones más elevadas de polisacárido inhibidor de adsorción.
En particular, las preparaciones de enzima de glucosa iso-
20 merasa contienen generalmente cantidades significativas de
polisacárido inhibidor de adsorción. Como consecuencia, la
presente invención es particularmente útil para inmovili-
zar glucosa isomerasa y todavía más particularmente útil
cuando la preparación de glucosa isomerasa ha sido obteni-
25 da a partir de un microorganismo, tal como un microbio Ac-
tinomycetes de la familia Streptomyces o una bacteria que
incluye aquellas de la familia Lactobacillus particularmen-
te L. brevis que produce la enzima intracelularmente.

 Se obtiene una preparación enzimática rápidamente
30 a partir del microorganismo que produce la enzima extrace-

1 lularmente mediante técnicas conocidas. Para estos microor-
ganismos, es habitual eliminar simplemente las células (por
filtración, centrifugación o similares) del medio que con-
tiene la enzima. El medio restante es una preparación ade-
5 cuada.

Para microorganismos que se producen intracelu-
larmente, es necesario separar primero la enzima de las cé-
lulas del microorganismo. Son métodos de ejemplo para lle-
var a cabo esta separación los que se describen en las pa-
10 tentes norteamericanas Nos. 3.708.397; 3.850.751 y 3.868.304.
De este modo, las células se rompen normalmente por autóli-
sis (o tratamiento con ondas supersónicas) trituración, li-
sis ácida o similares. A continuación, puede emplearse fil-
tración para eliminar los restos celulares, permaneciéndo
15 una preparación enzimática que contiene el polisacárido
inhibidor de adsorción.

Cuando se desea, la preparación enzimática cruda
obtenida directamente del medio de cultivo o los microor-
ganismos en si mismos pueden purificarse mediante técnicas
20 convencionales. Por ejemplo, la preparación cruda puede
tratarse con protamina o similares para precipitar y elimi-
nar ácidos nucleicos. Las preparaciones pueden también so-
meterse a concentración y comúnmente lo son. Esto produce
un extracto que tiene una actividad de unidad superior y
25 puede reducir adicionalmente los contaminantes. Concomiten-
tamente a estos tratamientos de purificación convencional
para las preparaciones crudas, sin embargo, el polisacári-
do inhibidor de adsorción permanece en la preparación, ge-
neralmente a un nivel de cierto porcentaje o más en rela-
ción al peso proteínico de la enzima. Este polisacárido
30

1 -cuya existencia y efecto no parece haber sido apreciado-
debe ser completamente y esencialmente eliminado para per-
mitir una adsorción enzimática máxima.

5 El carácter preciso de estos polisacáridos puede
variar de acuerdo a la fuente. Son, por lo tanto, descri-
tos mejor simplemente por su capacidad de ser adsorbidos
por los portadores enzimáticos convencionales y de inhibir
(o interferir) con la adsorción de la enzima. Además, sin
embargo, pueden generalmente caracterizarse como de eleva-
10 dos pesos moleculares y no dializables.

Para separar el polisacárido de una preparación
enzimática cruda o purificada, es adecuada una variedad de
técnicas. Los polisacáridos pueden, por ejemplo, separarse
y eliminarse de la preparación a través del contacto con
15 una resina de intercambio iónica que adsorberá selectiva-
mente el polisacárido mientras permanece esencialmente iner-
te en relación a la enzima. Alternativamente, puede agre-
garse un solvente orgánico a la preparación en una concen-
tración suficiente para precipitar la enzima selectivamen-
20 te. La enzima precipitada puede luego disolverse en un sol-
vente tal como agua para producir una solución enzimática
reconstituida esencialmente libre de polisacárido inhibi-
dor de adsorción. Similarmente, puede agregarse una sal a
la preparación en una concentración suficiente para preci-
25 pitar selectivamente la enzima, que puede ser luego redi-
suelta para producir la solución deseada libre de polisa-
cárido.

Los adsorbentes que pueden eliminar selectivamen-
te polisacáridos (mientras adsorben poca o ninguna enzima)
30 y que pueden emplearse con el propósito de separar el poli

1 -sacárido de una solución enzimática determinada incluyen:
resinas de intercambio aniónicas tales como resina de in-
tercambio aniónico fuertemente básicas (tipo I), resinas
de intercambio aniónico fuertemente básicas (tipo II), re-
5 sinas de intercambio aniónico moderadamente básicas y resi-
nas de intercambio aniónico débilmente básicas. Son ejemplos
de las resinas las que se indican Resinas de Intercambio
Iónico de R. Kunin and R.J. Myers, John Wiley & Sons 1952,
y en "DIAION - Manual de las Resinas de Intercambio Ionico",
10 una publicación de Mitsubishi Chemical Industries Ltd. Sin
embargo, es posible emplear cualquier material que adsorba
poca o ninguna enzima pero que sea capaz de adsorber selec-
tivamente y eliminar los polisacáridos que existen en la
solución enzimática. Son adsorbentes adecuados adicionales
15 los que pueden identificarse mediante ensayos de rutina de
la manera establecida en los ejemplos que siguen.

Son ejemplos de resinas especialmente preferidas
las Lewatit MP-500, Lewatit M-504, Lewatit CA-9268HL (to-
dos los anteriores son nombres de productos de resinas de
20 Bayer Co., Ltd., of West Germany), IMAC A-27, IMAC 85-40,
y IMAC 88-50 (todos los que anteceden son nombres de pro-
ductos de resina de Shinetau Kagaku Co., Ltd.). Los grupos
de intercambio de las resinas de intercambio iónico antes
mencionadas incluyen cualquiera de OH, Cl, SO₄ y similares,
25 pero es preferible que los grupos de intercambio sean Cl
deseablemente originados a partir de NaCl ó HCl.

Quando se separa el sacárido de la enzima con re-
sina de intercambio aniónico, la preparación enzimática de-
be tener normalmente una concentración de desde 100 IGIU/ml
30 a 5.000 IGIU/ml, de preferencia aproximadamente 500 IGIU/ml.

1 Tal concentración puede obtenerse por dilución o concentración, según se requiera. La solución se pone luego simplemente en contacto con la resina de intercambio iónico antes mencionada en una columna u otro recipiente adecuado.

5 Con relación a la actividad de la enzima, la expresión "IGIU" es una abreviatura de Unidad de Isomerasa Glucosa Internacional. Un IGIU de la enzima se define como la cantidad que produce (en, por ejemplo, el caso de glucosa isomerasa) 1 micromol de fructosa por minuto, en una
10 solución 0,1 molar de glucosa a pH 7,5 y 60°C, en presencia de 0,01 MgCl₂ molar y 0,001 CoCl₂ molar, usando el siguiente procedimiento de ensayo, que involucra una determinación espectrofotométrica de la cetosa producida a partir de una solución de glucosa bajo un conjunto de condiciones estandarizadas.

15 Se prepara una solución de la siguiente manera:

Solución de Carga para Ensayo

Componente	Cantidad
0,01 M MgCl ₂	1 ml
0,001 M CoCl ₂	1 ml
1,0 M Fosfato buffer, pH 7,5	0,5 ml
D-glucosa anhidra	1,44 g
25 Agua destilada	Para completar hasta un volumen total de 7,5 ml

La preparación enzimática a ser ensayada se diluye primero de modo que contenga de 1 a 6 IGIU/ml.

30 Se lleva a cabo una isomerización enzimática agre

1 gando un ml de la preparación enzimática a 3 ml de la so-
lución, e incubando durante 30 minutos a 60°C. Al final
del período de incubación, se toma un alícuota de 1 ml y
se enfría en 9 ml en volúmen de ácido perclórico 0,5 N.
5 La alícuota enfriada se diluye luego hasta el volúmen total
de 250 ml. Como control, con propósito de comparación, se
lleva a cabo también un ensayo de glucosa substituyendo un
ml de agua por un ml de la preparación enzimática en forma
de solución, al comienzo del período de incubación. Luego
10 se determina la cetosa mediante el método de cisteína-áci-
do sulfúrico. Para los propósitos de este ensayo, un IGIU
se define como la cantidad de actividad enzimática que se
requiere para producir un micromol de fructosa por minuto
bajo las condiciones de isomerización antes descritas.

15 La adsorción del polisacárido en, por ejemplo,
una columna debe llevarse a cabo haciendo pasar la prepa-
ración enzimática a través de la columna a un régimen de
flujo de BVH 0,5 a BVH 10, de preferencia a BVH 1,0, o ha-
ciendo circular la preparación a través de la columna por
20 un período de 3 a 24 horas, de preferencia de 10 a 15 ho-
ras. BVH referido también como SV o "velocidad espacial"
es el régimen de flujo de la columna en volúmenes del he-
cho por hora.

25 Al llevar a cabo la adsorción en un sistema en
tandas dentro de un recipiente, la preparación enzimática
se pone generalmente en contacto con el adsorbente antes
mencionado mientras se agita por un período que varía des-
de 30 minutos hasta 24 horas, de preferencia durante 2 a 5
horas. De esta manera, se adsorbe el polisacárido y se se-
para de la preparación enzimática.
30

1 En el momento de la adsorción del polisacárido
el pH de la preparación enzimática debe estar dentro de la
gama de 4 y 11, y de preferencia en la vecindad de 5. Ade-
más su temperatura debe estar en la gama de 4° a 60°C,
5 siendo especialmente deseable las temperaturas ambiente.

Al llevar a cabo el método antes mencionado de
emplear un solvente orgánico para separar el polisacárido,
el solvente puede ser cualquiera que sea capaz de precipi-
tar la enzima mientras causa poca o ninguna precipitación
10 de los polisacáridos co-existentes. Los solventes represen-
tativos son metanol, etanol, propanol, isopropanol, t-buta-
nol, acetona, p-dioxano o mezclas de los mismos.

Se agregan solventes orgánicos para preparación
en una cantidad suficiente para llevar a cabo la precipi-
tación de la enzima mientras no se produce substancialmen-
te ninguna precipitación del polisacárido. Por ejemplo,
cuando se usa isopropanol, debe agregarse una cantidad su-
ficiente para lograr una concentración de 30 a 38% en vo-
lúmen, de preferencia aproximadamente 30% en volúmen. La
20 acetona debe agregarse para proporcionar una concentración
de 27 a 38% en volúmen, de preferencia entre 30 y 33% en
volúmen; etanol, 36 a 45%, de preferencia entre 38 y 42%
en volúmen; metanol, 44 a 55%, propanol, 30 a 38% en volúmen;
t-butanol, 28 a 36% en volúmen; y p-dioxano, 28 a 30% en
25 volúmen.

Para usar estos solventes orgánicos, la prepara-
ción enzimática se ajusta generalmente en primer lugar a un
pH de entre 5 y 8, de preferencia aproximadamente pH 7, y
el solvente orgánico (pre-enfriado a una temperatura de
30 10°C a -20°C) es luego agregado mientras se agita suavemen-

1 te hasta que se alcanza la concentración deseada. Una vez
lograda la concentración de solvente apropiada, se prosi-
gue la agitación durante 30 minutos a 2 horas más. A conti-
nuación, se recoge la enzima precipitada, ya sea por sepa-
5 ración centrífuga o por decantación o similares, y luego
se disuelve en un solvente tal como agua.

Las sales que pueden agregarse a las soluciones
enzimáticas para llevar a cabo una precipitación selecti-
va incluyen sulfato de amonio, sulfato de sodio y sulfato
10 de magnesio. Sin embargo, es igualmente posible emplear
cualquier otra sal que sea capaz de llevar a cabo esta fun-
ción.

Estas sales deben agregarse a la preparación pa-
ra obtener una concentración tal que produzcan la precipi-
15 tación selectiva enzimática deseada. En este caso de sul-
fato de amonio, por ejemplo, la adición debe llevarse a
cabo para proporcionar un nivel del 45% o superior, de pre-
ferencia 50% a 60% de saturación por peso total.

La sal se agrega de manera preferente a una pre-
20 paración enzimática que tiene un pH comprendido entre 5 y 8,
de preferencia a un pH de aproximadamente 7, mientras se
agita suavemente. Una vez lograda la concentración apropia-
da de la sal, se continúa la agitación durante 30 minutos
a dos horas más. A continuación, se recoge la enzima preci-
25 pitada, ya sea por separación centrífuga o por decantación,
y esta es luego redisuelta.

Una solución enzimática, que se obtiene de la ma-
nera antes mencionada y que ha sido completa esencialmente
liberada de polisacárido inhibidor de adsorción, puede lue-
30 go ponerse en contacto con un portador de adsorción para

1 -inmovilizar enzimas sobre el mismo.

Entre los portadores de adsorción adecuados se incluyen los materiales conocidos como resinas de intercambio iónico DEAE-celulosa, carbonato de magnesio básico, 5 sílice coloidal, carbón activado, y Alúmina Porosa controlada.

Entre las resinas de intercambio iónico adsorptivas que se dan como ejemplo se cuentan las Amberlite IRA-904, Amberlite IRA-938, Amberlite IRA-93, (todos los que preceden son nombres de marcas de productos de Tokyo Yuki Kagaku 10 Kogyo Co., Ltd.), Diaion PA-302, Diaion PA-304, Diaion PA-308, Diaion WA-20 (todos los que anteceden son nombres de marcas de productos de Mitsubishi Kasei Kogyo Co., Ltd.), Duolite A-2, Duolite A-7, Duolite S-3, Duolite ES-561 y 15 Duolite ES-562 (todos los que anteceden son nombres de marcas de productos de Diamond Shamrock Chemical Co., Ltd., of the U.S.A.).

En el caso en que el portador sea una resina de intercambio iónica, es posible que el grupo de intercambio 20 tenga cualquiera de las formas OH-, Cl-, SO₄-, etc., pero es más deseable emplear la forma Cl derivada por regeneración con NaCl o HCl.

Los portadores de celulosa DEAE útiles para inmovilizar enzimas incluyen materiales conocidos tales como 25 Selectacel-20 (el nombre de fábrica de un producto de Brown Co., de Alemania Occidental); como sílice coloidal es posible mencionar LUDOX HB-30, LUDOX AM, LUDOX TM (todos los precedentes son nombres de fábrica de productos de DuPont Co., Ltd. de EE.UU.) Snowtex 20, Snowtex 30, Snowtex N (to- 30 dos los que anteceden son nombres de fábrica de productos

1 de Nissan Keguku Co., Ltd.). Una Alúmina Porosa controlada
del ejemplo es el producto de Corning Co., Ltd. de EE.UU.
y como carbón activado es posible mencionar Darco S-51 y
5 Darco G-60 (ambos nombres de fábrica de productos de Atlas
Co., Ltd. de Dinamarca).

Al llevar a cabo la adsorción o inmovilización
de enzima por contacto de una solución enzimática que no
contiene substancialmente polisacárido con uno de los por-
tadores antes mencionados, la solución -ya sea tal cual o
10 después de haber sido ajustada a la concentración deseada
(por ejemplo, una concentración de glucosa isomerasa de
50 U/ml a 1.000 U/ml, de preferencia aproximadamente 300
U/ml) por concentración o dilución— se pone en contacto
con el portador, ya sea en una columna o en cualquier otro
15 recipiente apropiado.

En el momento de la inmovilización, es deseable
que el pH de la solución enzimática esté dentro de la gama
de 4 a 11, especialmente en la vecindad de pH 7 a 8. Además,
la temperatura está de manera deseada entre 4°C y 60°C,
20 especialmente a aproximadamente la temperatura ambiente.

Cuando la inmovilización se lleva a cabo en una
columna, la solución enzimática debe introducirse a dicha
columna a un régimen de flujo de BVH 0,5 a BVH 10, de pre-
ferencia a BVH 1,0. Alternativamente, la adsorción puede
25 llevarse a cabo por circulación a través de la columna por
un período de 3 horas a 24 horas, de preferencia por un pe-
riodo de 10 horas o 15 horas.

Cuando la inmovilización se lleva a cabo en un
recipiente adecuado para adsorción del tipo en tanda, la
30 solución enzimática debe ponerse en contacto con el porta-

1 dor por un período de 30 minutos a 24 horas, de preferen-
cia por un período comprendido entre 2 horas y 5 horas,
mientras se agita la mezcla.

5 En la sección que sigue, se presentan algunos
ejemplos para demostrar el efecto inhibitorio de los sacá-
ridos en la adsorción de la enzima sobre un portador.

Ejemplo Experimental 1

10 Streptomyces olivochromogenes (FERM 1640, ATCC
21114), se cultivó por sacudimiento en un medio de cultivo
líquido a 30°C por aproximadamente 50 horas. El material
de cultivo se centrifugó luego durante 20 minutos a 10.000
rpm para recoger las células. Las células húmedas se pesa-
ron y luego se suspendieron en agua de intercambio iónico
15 (3 volúmenes) que contiene 10 mM MgCl₂. A continuación se
agregaron 0,02% de lisozima (un producto de Behringer-Menheim
Co.) y 1% de tolueno en peso de células húmedas y se llevó
a cabo la lisis durante 24 horas a 30°C bajo agitación sua-
ve. El lisado resultante se centrifugó luego durante 20 mi-
20 nutos a 10.000 rpm y se eliminaron los desechos celulares.

A continuación se agregó un volúmen igual de
alcohol isopropílico al líquido sobrenadante mientras se
agitaba suavemente. Esta solución mezclada se centrifugó
adicionalmente y se recogió el precipitado. Luego se disol-
25 vió el precipitado en una pequeña cantidad de agua desioni-
zada que contenía 10 mM MgCl₂. El rendimiento de la serie
precedente de operaciones dió como resultado una recupera-
ción de casi el 70% de la glucosa isomerasa intracelular
inicial en forma soluble.

30 Se empleó la misma cepa de microorganismo y se

1 repitieron las operaciones precedentes 19 veces de modo
que se prepararon 19 soluciones diferentes de glucosa iso-
merasa. Estas 19 soluciones de glucosa isomerasa fueron
luego empleadas en el experimento que se describe más aba-
5 jo.

Se empaquetaron 19 columnas que tenían dimensio-
nes de 1,6 x 20 cm cada una con 10 ml de Amberlite IRA-904
(el nombre de fábrica de un producto de Tokyo Yuki Kagaku
Kogyo Co., Ltd.), una resina de intercambio iónico fuerte-
10 mente básica. Luego se lavaron las columnas con agua desio-
nizada. Las 19 soluciones de glucosa isomerasa previamente
mencionadas se diluyeron de modo que sus concentraciones
fueron de 500 U/ml y luego se suministraron 10 ml a cada
una de las columnas preparadas a un régimen de flujo de
15 BVH 1,0. Estas soluciones de glucosa isomerasa se hicieron
circular en sus columnas respectivas al mismo régimen de
flujo durante una noche para adsorber e inmovilizar la en-
zima.

Cada una de estas columnas se lavó luego con 100
20 ml de agua desionizada para eliminar la materia no adsorbi-
da de las columnas, y se determinó la cantidad de la acti-
vidad de glucosa isomerasa en las soluciones de lavado.
Las ecuaciones indicadas más abajo fueron luego utilizadas
para calcular la cantidad de actividad de la glucosa iso-
25 merasa adsorbida por mililitro de la resina de intercambio
iónico y la eficiencia de adsorción para cada una de las
19 columnas. La actividad total de la glucosa isomerasa
suministrada a la columna se designa como (A), la activi-
dad de la glucosa isomerasa hallada en la solución de lava-
30 do como (B), y el volumen (ml) de la resina de intercambio

1 iónico como (C).

$$\text{Actividad GI adsorbida/ml IER} = \frac{A - B}{C}$$

5

$$\text{Eficiencia de Adsorción} = \frac{A - B}{A}$$

A continuación, se dializaron alícuotas de 5 ml cada una de las 19 glucosa isomerasa antes mencionada durante una noche contra agua desionizada que contenía 10 mM MgCl₂ y 1 mM CoCl₂. La diálisis removió el propanol y los sacáridos de bajo peso molecular contenidos en la solución de glucosa isomerasa, pero se retuvieron los polisacáridos no dializables. Las actividades de la glucosa isomerasa de estas soluciones de glucosa isomerasa dializada se determinaron, y se midieron sus contenidos de polisacárido mediante el método de fenol-ácido sulfúrico. La cantidad de polisacárido por unidad de glucosa isomerasa fué también calculada.

10

15

Las 19 soluciones de glucosa isomerasa se colocaron en el orden de la eficiencia de adsorción más elevada para Amberlite IRA-904. Estas se enumeran en la Tabla 1 que se acompaña como soluciones de glucosa isomerasa A, B, C, —Q, R, y S, conjuntamente con los resultados de las determinaciones descritas en lo que antecede.

20

Los resultados presentados en la Tabla 1, muestran que la presencia de una apreciable cantidad de polisacáridos de elevado peso molecular (que no se elimina aún mediante diálisis durante toda una noche) interfiere con la adsorción de la glucosa isomerasa por la resina de intercambio iónico.

25

30
27049

1

TABLA 1

5

10

15

20

25

Solución de glucosa isomerasa	Cantidad adsorbida (resina U/ml)	Eficiencia de adsorción (%)	Cantidad de polisacárido (γ/U)
A	381	76,2	4,7
B	371	74,2	5,5
C	342	68,4	10,9
D	341	68,2	8,2
E	326	65,2	9,1
F	313	62,6	8,3
G	308	61,6	10,4
H	305	61,0	12,2
I	286	57,2	12,1
J	256	51,2	14,4
K	255	51,0	14,5
L	248	49,6	12,5
M	247	49,4	15,1
N	241	48,2	19,4
O	235	47,0	16,0
P	227	45,4	16,7
Q	211	42,2	17,9
R	200	40,0	16,3
S	159	31,8	19,6

30

Ejemplo Experimental 2

La solución de glucosa isomerasa S, solución que mostraba la aglutinación más pobre de glucosa isomerasa al Amberlite IRA-904 de todas las 19 preparaciones de glucosa

1 isomerasa del Ejemplo Experimental 1, fué utilizada en los
siguientes experimentos.

5 Veinte mililitros de solución S (que contiene
40.000 unidades de glucosa isomerasa) fueron dializados du-
rante una noche contra 0,05 M tris-HCl de solución buffer
(pH 7,0; conteniendo 10 mM $MgCl_2$ y 1 mM $CoCl_2$). Esta solu-
ción de glucosa isomerasa dializada se suministró luego a
una columna de celulosa DEAE (que tiene dimensiones de
2,2 x 50 cm y que contiene 150 ml de celulosa DEAE). La co-
10 lumna había sido previamente equilibrada con el mismo buffer,
a un régimen de flujo de 38,5 ml/hr. La glucosa isomerasa
y los polisacáridos fueron luego adsorbidos sobre el porta-
dor.

15 La elución se llevó a cabo por el método de gra-
diente de concentración usando una gama de concentración
NaCl de desde 0 a 0,5 M. Se recogió el eluato en porciones
de 7 ml con un colector de fracciones. Se analizó cada
fracción para determinar su actividad de glucosa isomerasa,
su adsorbencia a 280 m μ , y su contenido de polisacáridos.
20 La Figura 1 ilustra los modelos de elución tras la glucosa
isomerasa (por ejemplo proteínas) y polisacárido.

Tal como resulta claro de la Figura 1, la gluco-
sa isomerasa se eluyó a una concentración de NaCl de 0,15
M, mientras que el polisacárido se eluyó a una concentra-
25 ción de NaCl de 0,1 M. Este resultado indica que la gluco-
sa isomerasa y el polisacárido que coexisten en la solución
de glucosa isomerasa se separaron exitosamente. La glucosa
isomerasa obtenida de esta manera se concentró usando 60%
de isopropanol, mientras que el polisacárido se concentró
30 en un evaporador. Este polisacárido se separó de la solución

1 de glucosa isomerasa S y una vez purificada se halló que
tenía un peso molecular promedio de aproximadamente 34.000.

Se aplicaron los mismos procedimientos experimen-
tales a las soluciones de glucosa isomerasa H y B del Ejem-
5 plo Experimental 1, y se obtuvieron resultados similares.

Ejemplo Experimental 3

Se siguió el procedimiento descrito en el
Ejemplo Experimental 2 y se separó el polisacárido y se con-
10 centró de la solución de glucosa isomerasa S, y se preparó
también la preparación de glucosa isomerasa purificada.
Estos dos materiales más la solución S, fueron luego emplea-
dos para los siguientes experimentos.

Tres columnas que tenían dimensiones de 1,6 x 20
15 cm fueron rellenas cada una con 10 ml de resina Amberli-
te IRA-904 y luego se lavaron bien con agua desionizada.
La solución S fué luego suministrada a la columna 1, la pre-
paración de glucosa isomerasa a la columna 2 y la columna
3 recibió una solución preparada por readición de polisa-
20 cárido a la preparación de glucosa isomerasa purificada.

En cada caso, la concentración de glucosa isome-
rasa se concentró hasta aproximadamente 500 U/ml y luego
las soluciones se suministraron a las columnas a un régimen
de flujo de BVH 1,0. Las soluciones se hicieron circular a
25 través de columnas durante una noche al mismo régimen de
flujo para efectuar la adsorción por la resina.

Las soluciones enzimáticas suministradas a cada
una de estas tres columnas contenían 5.000 unidades de ac-
tividad de glucosa isomerasa, y había 88 mg de polisacárido
30 contenido en cada una de las soluciones enzimáticas suminis-

1 -tradas a las columnas 1 y 3. Una vez completadas las opera-
 ciones de adsorción, cada una de las columnas se lavó con
 100 ml de agua desionizada para eliminar la materia no adsor-
 bida de los lechos de resina. Las cantidades de glucosa iso-
 5 merasa y polisacárido contenido en cada solución de lavado
 fué determinada, y los grados de adsorción para la glucosa
 isomerasa y polisacárido de las resinas de Amberlite IRA-904
 fueron calculados. Los resultados se presentan en la si-
 guiente tabla.

10

TABLA 2

Columna	Muestra	Eficiencia de Adsorción (%)		
		Glucosa Isomerasa	Polisacárido	
15	1	GI Solución S	28,3	76,0
	2	Solución GI purificada	99,0	-
	3	" " " con polisacárido agregado	26,4	81,4

20

A continuación, se siguió el procedimiento des-
 crito en el Ejemplo Experimental 2 y se prepararon las glu-
 cosa isomerasa y polisacáridos purificados preparados a
 partir de las soluciones de glucosa isomerasa H y B. Estos
 25 materiales se emplearon luego de la manera que acabamos de
 describir. Los resultados para estos experimentos se presen-
 tan en las siguientes dos tablas.

30

27049

1

TABLA 3

Columna	Muestra	Eficiencia de adsorción (%)	
		Glucosa Isomerasa	Polisacárido
1	GI Solución H	61,0	80,6
2	Solución GI purificada	99,3	-
3	" " " con polisacárido agregado	25,3	81,4

10

TABLA 4

Columna	Muestra	Eficiencia de adsorción (%)	
		Glucosa Isomerasa	Polisacárido
1	GI Solución B	74,2	88,5
2	Solución GI purificada	99,1	-
3	" " " con polisacárido agregado	27,6	76,1

20

25

Los datos muestran que el polisacárido en las soluciones de glucosa isomerasa es adsorbido por los portadores adsorbentes de glucosa isomerasa, por ejemplo las resinas de intercambio iónico, más selectivamente que la glucosa isomerasa en sí misma. Por lo tanto ejerce un sorprendente efecto de inhibición en la adsorción de la glucosa isomerasa. Resulta también claro que la eliminación, o reducción en la cantidad del polisacárido en las soluciones de glucosa isomerasa da como resultado una adsorción aumentada de

30

1 - la glucosa isomerasa.

Ejemplo Experimental 4

5 La solución de glucosa isomerasa S preparada en el Ejemplo Experimental 1 se dializó durante una noche a 4°C contra agua desionizada que contiene 10 mM MgCl₂ y 1 mM CoCl₂ (a la cual nos referiremos a continuación simplemente como agua desionizada). La solución de diálisis externa del agua desionizada cambió frecuentemente durante
10 el curso de la diálisis.

La solución dializada se dividió luego en alícuotas de 16 ml (conteniendo cada una 9,683 unidades de glucosa isomerasa y 189,79 mg de polisacárido) y se colocó en cada uno de los 10 recipientes de 50 ml. Se agregó lentamente isopropanol frío con agitación a cada recipiente en volúmenes respectivos de 6, 7, —, 14 y 15 ml. Se continuó la agitación durante 30 minutos a 4°C. Luego se transfirió cada mezcla a un tubo centrifugador y se llevó a cabo la centrifugación durante 15 minutos a 15.000 rpm.
15

20 Se eliminó el líquido sobrenadante por decantación y se descartó, y se disolvió el precipitado en aproximadamente 30 ml de agua desionizada. Cada una de las 10 soluciones obtenidas de esta manera fué colocada en un frasco volumétrico de 50 ml y se rellenó a 50 ml en volumen con
25 agua desionizada. Las actividades de glucosa isomerasa total y los contenidos de polisacárido se determinaron para cada una de estas soluciones.

La actividad de glucosa isomerasa total contenida en la solución original de glucosa isomerasa de 16 ml empleada se designó como E₁, y el contenido de polisacárido
30

1 do de la misma se designó como P_1 . La cantidad de activi-
dad de la glucosa isomerasa contenida en el material recu-
perado se denominó E_2 y la cantidad de polisacárido conte-
nido en la misma se denominó P_2 . Estos valores se sustitu-
5 yeron en las siguientes ecuaciones y se calcularon los por-
centajes de recuperación de la glucosa isomerasa y el poli-
sacárido para cada una de las 10 preparaciones tratadas con
isopropanol. Las cantidades de polisacárido por unidad de
glucosa isomerasa se calcularon también para cada una de
10 las soluciones obtenidas.

$$\text{GI recuperado} = \frac{E_2}{E_1} \times 100$$

$$\text{Polisacárido recuperado} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

15

$$\text{Polisacárido/U de GI } (\tau/U) = \frac{P_2}{E_2}$$

Los resultados de los cálculos usando estas ecua-
ciones se acompañan en la Tabla 5.

20

25

30

1

TABLA 5

Efecto de la concentración de isopropanol en la separación de enzima de glucosa isomerasa y polisacárido.

5

Conc. de Isopropanol (vol-%)	Actividad de la enzima recuperada (U)	Cantidad de poli-sacárido recuperado (%)	Cantidad de poli-sacárido recuperado (mg)	Unidad de poli-sacárido de GI (T/U)
------------------------------	---------------------------------------	--	---	-------------------------------------

10

27,3	397,2	4,10	9,41	4,96	23,69
30,4	6826	70,49	31,81	16,76	4,66
33,3	8831	91,20	30,76	16,21	3,48
36,0	9167	94,67	53,58	28,23	5,84
38,5	9176	94,76	107,17	56,46	11,68
40,7	9459	97,69	143,63	75,68	15,18
42,9	9613	99,28	148,42	78,20	15,44
44,8	9600	99,14	157,98	83,24	16,46
46,7	9600	99,14	165,97	87,45	17,29
48,4	9344	96,50	153,20	80,72	16,40

15

20

La Tabla 5 muestra que el polisacárido precipita escasamente, mientras que la concentración del isopropanol sea de 36,0% en volumen o menos, pero que precipita progresivamente con enzima a medida que la concentración de isopropanol aumenta. Por otra parte, es claro que el régimen de recuperación de la glucosa isomerasa es bastante elevado aún con una concentración de isopropanol de 33% en volumen. Empleando isopropanol en una concentración de 30 a 38% en volumen, de preferencia aproximadamente 36% en volumen, es por lo tanto posible precipitar de manera preferente la glucosa isomerasa con casi ninguna pérdida en su recuperación. Al mismo tiempo, el polisacárido que inhibe la adsor-

25

30

1 ción de la glucosa isomerasa en los portadores de resina
permanece atrás en la fase líquida.

A continuación, se empaquetaron 10 ml de resina
Amberlite IRA-904 húmeda en cada una de las 9 columnas que
5 tienen dimensiones de 1,6 x 20 cm, y estas se lavaron bien
con agua desionizada. La solución de glucosa isomerasa S
se manejó de la misma manera que en lo que antecede y se
trataron alícuotas de la misma con 9 concentraciones dife-
rentes de isopropanol (a 30,4% en volúmen y superiores).

10 Se obtuvieron precipitados de glucosa isomerasa y se disol-
vieron en agua desionizada. Las preparaciones enzimáticas
así preparadas se ajustaron de modo de contener 3.000 uni-
dades de glucosa isomerasa (en volúmenes de soluciones en-
zimáticas de 15,6 a 22 ml) y luego se hicieron circular a
15 través de las columnas antes mencionadas durante una noche
a un régimen de flujo de BVH1 y temperatura ambiente.

A continuación de la finalización de la circula-
ción y adsorción, cada una de las columnas se lavó con 50
ml de agua desionizada para eliminar la materia no adsorbi-
20 da en el lecho de resina. Las soluciones de lavado se ana-
lizaron para determinar sus contenidos de actividad de glu-
cosa isomerasa. Los resultados son tal como se muestran en
la Tabla 6 siguiente.

TABLA 6

25

		<u>Concentración de Isopropanol (% en vol.)</u>								
		30,4	33,3	36,0	38,5	40,7	42,9	44,8	46,7	48,
30	GI adsorbida por 1 ml de resina (U/ml)	300	300	300	285	256	250	241	217	198
	Eficiencia de adsorción (%)	100	100	100	95,0	85,3	83,3	80,3	72,3	66,

27049

1 Es evidente por los resultados presentados en la
Tabla 6 que las concentraciones de 30 a 38% en volúmen son
las más deseables cuando se emplea isopropanol para llevar
a cabo la precipitación preferencial de glucosa isomerasa
5 mientras que el polisacárido permanece atrás en la fase
líquida.

Ejemplo Experimental 5

10 Se empleó la solución de glucosa isomerasa diali-
zada preparada en el Ejemplo Experimental 4, y se colocaron
alícuotas de 16 ml (conteniendo 9.683 unidades de glucosa
isomerasa y 189,79 mg de polisacárido) de la solución enzi-
mática en 7 recipientes de 50 ml. Luego, mientras se agita-
ban las soluciones, se agregó lentamente acetona fría en
15 volúmenes de 6, 7, —, 11 y 12 ml a los recipientes. Se
continuó la agitación durante 30 minutos a 4°C. Las mezclas
fueron transferidas cada una a tubos de centrifugación, y
se llevó a cabo la centrifugación durante 15 minutos a
15.000 rpm.

20 Se decantaron y descartaron los líquidos sobrena-
dantes y se disolvieron los precipitados en aproximadamente
30 ml de agua desionizada. Estas soluciones se transfirieron
luego a frascos volumétricos de 50 ml y sus volúmenes
se completaron hasta 50 ml con agua desionizada. Cada una
25 de estas soluciones enzimáticas se analizó luego para deter-
minar su contenido de actividad total de glucosa isomerasa
y su contenido total de polisacárido. Los resultados de es-
te experimento se presentan en la Tabla 7.

30 Es claro que el polisacárido contenido en la so-
lución de glucosa isomerasa precipitó escasamente mientras

1 que la concentración de la acetona fué de 33,3% en volúmen
o menos. Precipita y se recupera con elevados promedios en
concentraciones de acetona de 36% en volúmen y superiores.
La glucosa isomerasa, por otra parte, se recupera con un
5 elevado promedio aún cuando la concentración de acetona sea
de 30,4% en volúmen.

TABLA 7

10 Efecto de la concentración de acetona en la separación de glucosa isomerasa y polisacárido.

	Conc. de acetona (% en vol)	Enzima recuperada Actividad (U)	Polisacárido recup. Cantidad (mg)	U de polisa cárido de GI Régimen (%)	U de polisa cárido de GI (r/U)	
15	27,3	7704	13,17	79,56	6,94	1,71
	30,4	9385	17,29	96,92	9,11	1,84
	33,3	9410	42,38	97,18	22,33	4,50
	36,0	9260	158,42	95,63	83,47	17,11
	38,5	9285	180,64	95,69	95,18	19,46
20	40,7	9272	189,28	95,76	99,73	20,41
	42,9	8833	181,06	91,22	95,40	20,50

25 Empleando acetona en una concentración de 30 a 33% en volúmen, es por lo tanto posible precipitar de manera preferente la glucosa isomerasa con casi ninguna pérdida en su capacidad de recuperación. Al mismo tiempo, el polisacárido que inhibe la adsorción de la glucosa isomerasa en los portadores de resina queda atrás en la fase líquida.

30 A continuación, se empaquetaron 10 ml de resina Amberlite IRA-904 húmeda, en cada una de las 7 columnas que

1 tienen dimensiones de 1,6 x 20 cm. Estas se lavaron bien
 con agua desionizada. La solución de glucosa isomerasa S se
 trató de la misma manera que lo que precede y se trataron
 alícuotas de la misma con 7 diferentes concentraciones de
 5 acetona. Se obtuvieron precipitados de glucosa isomerasa y
 se disolvieron en agua desionizada. Las soluciones enzimá-
 ticas así preparadas se ajustaron de modo de contener 3.000
 unidades de actividad de glucosa isomerasa (en volúmenes
 de solución enzimática de 16 a 19 ml) y luego se hicieron
 10 circular a través de unas columnas antes mencionadas duran-
 te la noche a un régimen de flujo de SV 1 y a temperatura
 ambiente.

Una vez completada la circulación y adsorción,
 cada una de las columnas se lavó con 50 ml de agua desioni-
 15 zada para eliminar la materia no adsorbida en el lecho de
 la resina. Se analizaron las soluciones de lavado para de-
 terminar sus contenidos de actividad de glucosa isomerasa.
 Los resultados se muestran en la tabla 8 siguiente.

20 TABLA 8

		<u>Concentración de acetona (% por vol.)</u>						
		27,3	30,4	33,3	36,0	38,5	40,7	42,9
25	Resina (U/ml) adsorbida GI/ml	300	300	300	219	158	149	151
	Eficiencia de adsorción (%)	100	100	100	73	52,7	49,7	50,3

30 Es evidente por los resultados presentados en la
 Tabla 8 que las concentraciones de 27 a 36% en volumen son
 27049

1 -las más deseables cuando se emplea acetona para llevar a
cabo la precipitación selectiva de la glucosa isomerasa.

Ejemplo Experimental 6

5 Se empleó la solución de glucosa isomerasa diali-
zada preparada en el Ejemplo Experimental 4, y se colocaron
alícuotas de 11 ml (que contienen 6.657 U de glucosa isome-
rasa y 130,48 mg de polisacárido) de esta solución enzimá-
tica en recipientes de 50 ml. Luego mientras se agitaba
10 suavemente las soluciones, se agregó lentamente etanol frío
en volúmenes de 6, 7, 8, 9, 10 y 11 ml a los recipientes.
Se continuó la agitación durante 30 minutos a 4°C. Luego
se transfirieron cada una de las mezclas a tubos de centri-
fugación. La centrifugación de éstos se llevó a cabo duran-
te 15 minutos a 15.000 rpm.

Se decantaron y descartaron los sobrenadantes,
y los precipitados se disolvieron cada uno en aproximada-
mente 15 ml de agua desionizada. Luego se transfirieron es-
tas soluciones a frascos volumétricos de 25 ml y sus volú-
20 menes se completaron hasta 25 ml con agua desionizada. Cada
una de estas soluciones enzimáticas fué luego analizada pa-
ra determinar su contenido total de actividad de glucosa
isomerasa y su contenido total de polisacárido. Los resul-
tados se presentan en la Tabla 9.

25

30

1

TABLA 9

Efecto de la concentración de etanol en la separación de glucosa isomerasa y polisacárido

5

Conc. de Etanol (% en vol.)	Enzima recuperada Actividad (U)	Polisacárido recuperado Cantidad (%)	Polisacárido recuperado Cantidad (mg)	Polisacárido recuperado (%)	Polisacárido r/U de GI
35,3	4605	67,68	4,67	3,58	1,04
38,9	6657	100	14,85	11,38	2,23
42,1	6624	99,50	40,31	30,89	6,09
45,0	6624	99,50	80,64	61,80	12,17
47,6	6421	96,46	95,60	73,27	14,89
50,0	6556	98,48	107,79	82,61	16,44

10

15

Es claro por los resultados presentados en la Tabla 9 que el polisacárido contenido en la solución de glucosa isomerasa precipitó escasamente y se recuperó mientras la concentración del etanol era de 42,1% en volúmen o menos. Precipita y se recupera en concentraciones de etanol progresivamente más elevadas de 46,0% en volúmen y superiores. La glucosa isomerasa, por otra parte, se somete a recuperación total en una concentración de etanol de 38,9% en volúmen.

20

25

Empleando etanol en una concentración de 38 a 42% en volúmen, es por lo tanto posible precipitar de manera selectiva la glucosa isomerasa con casi ninguna pérdida en su régimen de recuperación. Al mismo tiempo, el polisacárido que inhibe la adsorción de la glucosa isomerasa a los portadores de resina queda atrás en la fase líquida.

30

A continuación, se empaquetaron 10 ml de resina Amberlite IRA-904 húmeda en cada una de las 6 columnas que

27049

1 tienen dimensiones de 1,6 x 20 cm, y estas se lavaron bien
 con agua desionizada. La solución de glucosa isomerasa S se
 manejó de la misma manera que antes y se trataron alícuotas
 de la misma con 6 concentraciones diferentes de etanol. Se
 5 obtuvieron precipitados de glucosa isomerasa y se disolvie-
 ron en agua desionizada. Las soluciones enzimáticas así pre-
 paradas se ajustaron de modo de contener 3.000 unidades de
 actividad de glucosa isomerasa (en volúmenes de solución
 enzimática de 11,3 a 16,7 ml) y luego se hicieron circular
 10 a través de las columnas antes mencionadas durante una no-
 che a un régimen de flujo de BVH 1 y temperatura ambiente.

Una vez completada la circulación y adsorción, se
 lavó cada una de las columnas con 50 ml de agua desionizada
 para eliminar las materias no adsorbidas del lecho de resi-
 15 na. Las soluciones de lavado se analizaron para determinar
 sus contenidos de actividad de glucosa isomerasa. Los resul-
 tados se muestran en la Tabla 10 más abajo.

TABLA 10

	Concentración de etanol (% en Vol.)						
	35,3	38,9	42,1	45,0	47,6	50,0	
20							
	GI U/ml de resina adsorbida	300	300	300	293	247	233
25	Eficiencia de adsorción (%)	100	100	100	97,7	82,3	77,7

Es evidente por los resultados presentados en la
 Tabla 10 que las concentraciones de 36 a 45% en volumen son
 30 las más deseables cuando se emplea etanol para llevar a ca-

1 -bo la precipitación selectiva de glucosa isomerasa.

Ejemplo Experimental 7

5 Se llevó a cabo el tratamiento de diálisis tal como se describe en el Ejemplo Experimental 4 y se colocaron alícuotas de 16 ml (conteniendo 9.683 U de glucosa isomerasa y 189,79 mg de polisacárido) de la solución enzimática obtenida en cada uno de los 6 recipientes de 50 ml. Luego mientras se agitaba suavemente las soluciones a 4°C, 10 se agregó sulfato de amonio para dar un grado respectivo de saturación de 45%, 50%, 55%, 60%, 65% y 70%. Se continuó la agitación durante 30 minutos más. Luego se transfirió cada una de las mezclas a tubos de centrifugación. La centrifugación de estos se llevó a cabo durante 15 minutos a 15 15.000 rpm.

Se decantaron y descartaron los sobrenadantes, y cada uno de los precipitados se disolvió por separado en aproximadamente 30 ml de agua desionizada. Luego estas soluciones se transfirieron a frascos volumétricos de 50 ml 20 y sus volúmenes se completaron hasta 50 ml con agua desionizada. Cada una de estas soluciones enzimáticas fué luego analizada para determinar su contenido total de actividad de glucosa isomerasa y su contenido de polisacárido. Los resultados son tal como se presentan en la Tabla 11 más 25 abajo.

Es claro por los resultados presentados en la Tabla 11 que el polisacárido contenido en la solución de glucosa isomerasa precipita escasamente en grados de sulfato de amonio de saturación de 45% a 70%, o sobre la gama total 30 de los grados de saturación ensayados aquí. La glucosa iso-

1 merasa, por otra parte, precipita casi completamente y se recupera con un grado de saturación de sulfato de amonio de 50% o más.

5 Empleando sulfato de amonio, es posible precipitar selectivamente glucosa isomerasa a partir de una solución de glucosa isomerasa que contiene polisacárido.

TABLA 11

10 Efecto de concentración de sulfato de amonio en la separación de glucosa isomerasa y polisacárido

	Sulfato de amonio conc. (% saturado)	Enzima recuperada Actividad (U)	Polisacárido recup. Cantidad (%)	Polisacárido recup. Cantidad (mg)	Polisacárido recup. (%)	Polisacárido recup. T/U de GI
15	45	4499	46,46	7,91	4,17	1,76
	50	8264	85,35	16,76	8,83	2,03
	55	9096	93,94	15,18	8,00	1,67
	60	9585	98,99	16,76	8,83	1,75
	65	9683	100	22,77	12,00	2,36
20	70	9683	100	23,40	12,33	2,42

25 A continuación se empaquetaron 10 ml de resina Amberlite IRA-904 húmeda en cada una de 6 columnas que tienen dimensiones de 1,6 x 20 cm, y estas se lavaron bien con agua desionizada. La solución de glucosa isomerasa S se trató de la misma manera que antes y se trataron alícuotas de la misma con 6 concentraciones diferentes de sulfato de amonio. Se obtuvieron precipitados de glucosa isomerasa y se disolvieron en agua desionizada. Las soluciones enzimáticas

30 así preparadas se ajustaron de modo de contener 3.000 unidades

1 des de actividad de glucosa isomerasa (en volúmenes de so-
lución de enzima de 15,5 a 33,3 ml) y luego se hicieron cir-
cular a través de las columnas antes mencionadas durante
una noche a un régimen de flujo de BVH 1 y temperatura
5 ambiente.

'Una vez completada la circulación y adsorción,
cada una de las columnas se lavó con 50 ml de agua desioni-
zada para eliminar la materia no adsorbida del lecho de re-
sina. Las soluciones de lavado se analizaron para determi-
10 nar su contenido de actividad de glucosa isomerasa. Los re-
sultados se muestran en la Tabla 12.

Es evidente por los resultados presentados en la
Tabla 12 que concentraciones de sulfato de amonio con gra-
dos de saturación de 45% y más elevados son los más desea-
15 bles cuando se emplea sulfato de amonio para llevar a cabo
la precipitación selectiva de glucosa isomerasa.

TABLA 12

20	Concentración de sulfato de amonio (% de saturación)					
	45	50	55	60	65	70
GI U/ml de resina adsorbida	300	300	300	300	300	300
25 Eficiencia de adsorción (%)	100	100	100	100	100	100

30 La solución que contiene glucosa isomerasa que se
obtiene de la manera antes mencionada que había sido comple-
tamente o casi completamente liberada de polisacárido, se
puso luego en contacto con un portador adsorbente de gluco-

1 sa isomerasa y la glucosa isomerasa se adsorbió sobre el mismo.

A continuación, en la presente invención se explicará más detalladamente mediante la presentación de ejemplos aplicados y también de ejemplos comparativos. La presente invención no queda limitada sin embargo por estos ejemplos.

EJEMPLO 1

Se empaquetaron 10 mililitros de Lewatit M-500 húmeda (nombre de marca de un producto de Bayer Co., Ltd., de Alemania Occidental), una resina de intercambio aniónico fuertemente básica (tipo-I), en una columna que tiene dimensiones de 1,6 x 20 cm. Esta columna de resina se trató luego con 50 ml de solución de NaCl 2 M a BVH 1, antes de un cuidadoso lavado con agua. A continuación, se empleó la solución de glucosa isomerasa S preparada tal como se describe en el Ejemplo Experimental 1, y se hicieron circular 3 ml (conteniendo 5.000 U de glucosa isomerasa y 98 mg de polisacárido en un total de contenido de sacárido de 112 mg) a través de la columna antes mencionada durante la noche a un régimen de flujo de BVH 1 y temperatura ambiente.

Esta columna se lavó luego con 20 ml de agua desionizada para eliminar la materia no adsorbida del lecho de la resina. La solución de lavado se analizó luego para determinar los contenidos de actividad de glucosa isomerasa y sacáridos totales, y se calcularon las eficiencias de adsorción de la glucosa isomerasa y los sacáridos totales. Estos resultados indicaron que la glucosa isomerasa era escasamente adsorbida por el Lewatit M-500, mientras que se adsorbieron 80,1% de los sacáridos totales.

1 A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberlite
IRA-904 húmeda (marca de un producto de Tokyo Yuki Kagaku
Kogyo Co., Ltd.), en una columna que tiene dimensiones
de 1,6 x 20 cm, y esta columna se lavó cuidadosamente con
5 agua desionizada. Luego la solución de glucosa isomerasa
obtenida por eliminación de la mayoría de los polisacáridos
de la solución de glucosa isomerasa S tratándola tal
como se ha descrito previamente en una columna de Lewatit
M-500 se empleó en un volumen de 15 ml (conteniendo 3.000
10 U de glucosa isomerasa) se suministró dicha columna de
Amberlite IRA-904 y se hizo circular a través de la misma
durante la noche a un régimen de flujo de SV 1 y a temperatura
ambiente.

15 Luego se lavó la columna con 50 ml de agua desionizada
para eliminar la materia no adsorbida desde el lecho de la
resina y la solución de lavado se analizó para determinar su
contenido de glucosa isomerasa. Los resultados confirmaron que
un 99,4% de la glucosa isomerasa suministrada fué adsorbida
por la resina Amberlite IRA-904. Esta Amberlite IRA-904 con
20 glucosa isomerasa adsorbida en la misma puede emplearse como
una glucosa isomerasa inmovilizada.

EJEMPLO 2

25 Diez mililitros de Lewatit M-504 húmedo (marca de un producto
de Bayer Co., Ltd., de Alemania Occidental), una resina de
intercambio aniónico fuertemente básica de tipo I, fueron
empaquetados en una columna de 1,6 x 20 cm. Esta columna se
trató luego con 50 ml de una solución NaCl 2 M en BVH 1,
seguido por lavado cuidadoso con agua. Se empleó la solución
30 de glucosa isomerasa S preparada tal

1 como se describe en el Ejemplo Experimental 1 y se hicieron
circular 3 ml (conteniendo 5.000 U de glucosa isomerasa y
98 mg de polisacárido en un total de un contenido de sacá-
rido de 112 ml), a través de la columna antes mencionada
5 durante la noche a un régimen de flujo de SV 1 y a tempera-
tura ambiente.

Luego se lavó esta columna con 20 ml de agua de-
sionizada para eliminar la materia no adsorbida del lecho
de la resina. La solución de lavado se analizó luego para
10 determinar sus contenidos de actividad de glucosa isomera-
sa y sacáridos totales, y se calcularon las eficiencias de
adsorción para la glucosa isomerasa y los carbohidratos to-
tales. Los resultados indicaron que la glucosa isomerasa
fué escasamente adsorbida por el Lewatit M-504, mientras
15 que se adsorbieron 81,0% de los sacáridos totales.

A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberli-
te IRA-904 en una columna de 1,6 x 20 cm, y esa columna se
lavó luego cuidadosamente con agua desionizada. La solución
de glucosa isomerasa obtenida por eliminación de la mayor
20 parte de sacáridos de la solución de glucosa isomerasa S
tratándola tal como se ha descrito previamente en una co-
lumna de Lewatit M-504 fué empleado en un volúmen de 15 ml
(conteniendo 3.000 U de glucosa isomerasa) y se suministró
a la columna de Amberlite IRA-904 y se hizo circular a tra-
25 vés de la misma durante la noche a un régimen de flujo de
BVH 1 y a temperatura ambiente.

Esta columna se lavó luego con 50 ml de agua de-
sionizada para sacar toda la materia no adsorbida desde el
lecho de la resina, y la solución lavada se analizó para
30 determinar su actividad de glucosa isomerasa. Los resulta-

1 dos confirmaron que 99,5% de la glucosa isomerasa fué ad-
sorbida por la resina Amberlite IRA-904.

EJEMPLO 3

5 Diez mililitros de Lewatit CA-9268 HL húmeda
(marca de un producto de Bayer Co., Ltd., de Alemania Occi-
dental), una resina de intercambio aniónico fuertemente
básica de tipo II, fué empaquetada en una columna de 1,6 x
20 cm. Esta columna se trató luego con 50 ml de una solu-
10 ción NaCl 2 M a SV 1, seguido por un lavado cuidadoso con
agua. A continuación, se empleó la solución de glucosa iso-
merasa S preparada tal como se ha descrito en el Ejemplo
Experimental 1 y se hicieron circular 3 ml (conteniendo
5.000 U de glucosa isomerasa y 98 ml de polisacárido de un
15 total de contenido de sacárido de 112 mg) a través de la
columna antes mencionada durante la noche a un régimen de
flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente.

Esta columna se lavó luego con 20 ml de agua
desionizada para eliminar la materia no adsorbida desde el
20 lecho de la resina. La solución de lavado se analizó luego
para determinar sus contenidos de actividad de glucosa iso-
merasa y sacáridos totales, y se calcularon las eficiencias
de adsorción para la glucosa isomerasa y los sacáridos to-
tales. Los resultados indicaron que la glucosa isomerasa
25 fué escasamente adsorbida por Lewatit CA-9268 HL, mientras
que se adsorbieron 87,9% de los sacáridos totales.

A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberli-
te IRA-904 húmeda en una columna de 1,6 x 20 cm, y esta co-
luna se lavó luego cuidadosamente con agua desionizada.
30 Luego la solución de glucosa isomerasa que se obtuvo por

1 -eliminación de la mayor parte del polisacárido desde la so-
lución de glucosa isomerasa S tratándolo tal como se ha des-
crito previamente en una columna de Lewatit CA-9268 HL fué
5 empleada en un volumen de 15 ml (conteniendo 3.000 U de glu-
cosa isomerasa) y se suministró a la columna de Amberlite
IRA-904 y se hizo circular a través de la misma durante la
noche a un régimen de flujo de BVH 1 y a temperatura ambien-
te.

10 La columna se lavó luego con 50 ml de agua desio-
nizada para eliminar la materia no adsorbida desde el lecho
de la resina, y la solución del lavado se analizó para de-
terminar su actividad de glucosa isomerasa. Los resultados
confirmaron que un 100% de la glucosa isomerasa suministra-
da fué adsorbida por la resina Amberlite IRA-904.

15

EJEMPLO 4

Diez mililitros de IMAC S5-40 húmeda (marca de un
producto de Shinatsu Kagaku Co. Ltd) una resina de inter-
cambio aniónico fuertemente básica, fueron empaquetados en
20 una columna de 1,6 x 20 cm. Esta columna se trató luego con
50 ml de solución de NaCl 2 M a BVH 1, seguido por un la-
vado cuidadoso con agua. A continuación, se empleó la solu-
ción de glucosa isomerasa S preparada como se describe en
el Ejemplo Experimental 1 y se hicieron circular 3 ml (con-
25 teniendo 5.000 U de glucosa isomerasa y 98 mg de polisacá-
rido en un total de contenido de sacárido de 112 mg) a tra-
vés de la columna antes mencionada durante una noche a un
régimen de flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente.

30

Esta columna se lavó luego con 20 ml de agua
desionizada para eliminar la materia no adsorbida desde el

1 lecho de la resina. La solución de lavado se analizó luego
para determinar sus contenidos de actividad de glucosa iso-
merasa y sacáridos totales y se calcularon las eficiencias
de adsorción para la glucosa isomerasa y los sacáridos to-
5 tales. Los resultados indicaron que la glucosa isomerasa
fué escasamente adsorbida por IMAC S5-40, mientras que se
adsorbieron 68,2% de sacáridos totales.

A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberli-
te IRA-904 húmeda en una columna de 1,6 x 20 cm, y esta co-
10 lumna se lavó cuidadosamente con agua desionizada. Luego
la solución de glucosa isomerasa que se obtuvo por elimina-
ción de la mayor parte del polisacárido desde la solución
de glucosa isomerasa S tratándola tal como se ha descrito
previamente en una columna de IMAC S5-40, fué empleada en
15 un volúmen de 15 ml (conteniendo 3.000 U de glucosa isome-
rasa) y se suministró a dicha columna de Amberlite IRA-904
y se hizo circular a través de la misma durante la noche a
un régimen de flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente.

Luego se lavó la columna con 50 ml de agua desio-
20 nizada para eliminar la materia no adsorbida desde el lecho
de la resina y la solución de lavado se analizó para deter-
minar su contenido de actividad de glucosa isomerasa. Los
resultados confirmaron que un 100% de la glucosa isomerasa
suministrada fué adsorbida por la resina Amberlite IRA-904.

25

EJEMPLO 5

Diez mililitros de IMAC S5-50 húmeda (marca de un
producto de Shinatsu Kagaku Co., Ltd.) una resina de inter-
cambio aniónico fuertemente básica, se empaquetó en una co-
30 lumna de 1,6 x 20 cm. Esta columna se trató luego con 50 ml

27049

1 de solución de NaCl 2 M a SV 1, seguido por un lavado cui-
doso con agua. A continuación, se empleó la solución de
glucosa isomerasa S preparada tal como se describe en el
Ejemplo Experimental 1 y se hicieron circular 3 ml (conte-
5 niendo 5.000 U de glucosa isomerasa y 98 mg de polisacárido
de un total de contenido de sacárido de 112 mg) a través
de la columna antes mencionada durante la noche a un régi-
men de flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente.

Luego se lavó esta columna con 20 ml de agua desio-
10 nizada para eliminar la materia no adsorbida desde el lecho
de la resina. La solución de lavado se analizó luego para
determinar sus contenidos de actividad de glucosa isomerasa
y sacáridos totales, y se calcularon las eficiencias de ad-
sorción para la glucosa isomerasa y los sacáridos totales.
15 Los resultados indicaron que la glucosa isomerasa fué esca-
samente adsorbida por IMAC S5-50, mientras que se adsorbie-
ron sobre la misma 66,9% de sacáridos totales.

A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberli-
te IRA-904 húmeda en una columna de 1,6 x 20 cm, y esta co-
20 lumna se lavó luego cuidadosamente con agua desionizada.
Luego la solución de glucosa isomerasa que se obtuvo elimi-
nando la mayor parte del polisacárido desde la solución de
glucosa isomerasa S tratándolo como se ha descrito previa-
mente en una columna de IMAC S5-50, se empleó en un volúmen
25 de 15 ml (conteniendo 3.000 U de glucosa isomerasa) y se su-
ministró a dicha columna de Amberlite IRA-904 y se hizo cir-
cular a través de la misma durante la noche a un régimen de
flujo de BVH 1 y temperatura ambiente.

La columna se lavó luego con 50 ml de agua desio-
30 nizada para eliminar la materia no adsorbida desde el lecho

1 de la resina, y la solución de lavado se analizó para deter-
minar su contenido de actividad de glucosa isomerasa. Los
resultados confirmaron que 100% de la glucosa isomerasa su-
ministrada fué adsorbida por la resina Amberlite IRA-904.

5

Ejemplo Comparativo 1

Diez mililitros de Amberlite IRA-904 húmeda se
empaquetaron en una columna de 1,6 x 20 cm y esta se lavó
cuidadosamente con agua desionizada. A continuación, la so-
lución de glucosa isomerasa S preparada tal como se descri-
be en el Ejemplo Experimental 1 se diluyó hasta una concen-
tración de 200 U/ml y luego se hicieron circular 15 ml (con-
teniendo 3.000 U de glucosa isomerasa) de esta solución a
través de la columna antes mencionada durante la noche a
un régimen de flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente.

15

Esta columna se lavó luego con 50 ml de agua
desionizada para eliminar la materia no adsorbida desde el
lecho de la resina. La solución de lavado se analizó luego
para determinar su actividad de glucosa isomerasa.

20

Los resultados indicaron que solamente un peque-
ño nivel, es decir 44,4% de la glucosa isomerasa fué adsor-
bida por la resina Amberlite IRA-904.

EJEMPLO 6

25

Streptomyces olivochromogenes (FERM 1640, ATCC 21,
114), un microorganismo productor de glucosa isomerasa, fué
inoculado a 100 frascos Erlenmeyer de 50 ml, conteniendo 50
ml de medio líquido por frasco. Estos fueron sometidos a
cultivo por sacudimiento a 30°C durante 48 horas. Todos es-
tos fluidos de cultivo se reunieron y se recogió el micelio

30

27049

1 por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos. Luego
se hizo la determinación del peso total de la célula húme-
da, el contenido de humedad, el peso en seco, y la activi-
dad de glucosa isomerasa después de acción ultrasonicación.
5 Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13

	Peso total de la célula en húmedo	:	278 g
10	Contenido de humedad	:	219 g
	Peso de la célula en seco	:	59 g
	Actividad de la glucosa isomerasa por 1 g de células húmedas	:	261 U

15 250 g de células húmedas se colocaron en un fras-
co Erlenmeyer de 1 litro y se suspendieron en 750 ml de
agua desionizada. Luego 50 mg de lisocima (0,02% en relación
a las células húmedas; un producto de Behringer Mannheim Co.)
y 10 ml de tolueno se agregaron y se dejó que ocurriera li-
sis mientras se agitaba esa mezcla suavemente a 30°C duran-
te 24 horas. Se centrifugó luego el lisado durante 20 minu-
tos a 15.000 rpm y se eliminaron los desechos celulares pre-
cipitados. El sobrenadante se llamó solución de glucosa iso-
merasa T, y se hizo la determinación de su actividad de
glucosa isomerasa, su contenido total de sacáridos, y des-
pués de llevar a cabo la diálisis de la solución durante
25 una noche su contenido de polisacárido. Los valores obteni-
dos se muestran en la Tabla 14 más abajo.

1

TABLA 14

Análisis de la solución de glucosa isomerasa T

	Volúmen	:	948	ml
5	Concentración de Actividad GI	:	68,77	U/ml
	Actividad Total GI	:	64.994	U
	Cantidad Total de sacárido	:	1.601	mg
	Cantidad Total de Polisacárido	:	1.298	mg
	Polisacárido/GI	:	19,97	γ/U

10

A continuación, 200 ml de esta solución de glucosa isomerasa T (este volúmen contenía 13.754 U de glucosa isomerasa y un valor total sacárido de 337,76 mg) se colocó en un frasco de 400 ml. Se agregó lentamente isopropanol

15

frio en un volúmen de 112,5 ml mientras se agitaba (la concentración final de isopropanol fué de 36% en volúmen). Se continuó la agitación durante una hora a 15.000 rpm. El sobrenadante se decantó y se descartó mientras que se disolvía el material precipitado en aproximadamente 30 ml de

20

agua desionizada y se transfería a un frasco volumétrico de 50 ml. Se completó el volúmen de éste hasta 50 ml con agua desionizada y luego se determinaron la actividad de la glucosa isomerasa y el contenido total de sacárido de esta

25

solución. Se halló que la recuperación de glucosa isomerasa fué de 95,67% mientras que la recuperación total de sacáridos fué de 8,24%. La relación del contenido total de sacárido a la actividad de glucosa isomerasa fué 2,12 (γ/U).

30

A continuación, 10 ml de Amberlite IRA-904 húmeda se empaquetaron en una columna de 1,6 x 20 cm y luego 12 ml (conteniendo 3.158 U de glucosa isomerasa) de la so-

27049

1 solución enzimática preparada tal como se describe más arri-
ba tratando la solución de glucosa isomerasa T con isopro-
panol en una concentración de 38% en volúmen, se suminis-
tró a esta columna y se hizo circular a través de la misma
5 durante la noche a un régimen de flujo de BVH 1 y a tempe-
ratura ambiente. 100% de la actividad de glucosa isomerasa
suministrada fué adsorbida por esta columna de Amberlite
IRA-904.

EJEMPLO 7

10 Se empleó la solución de glucosa isomerasa T pre-
parada en el Ejemplo 6 y 200 ml (conteniendo 13.754 U de
glucosa isomerasa y 337,76 mg de sacáridos) se colocó en
un frasco de 400 ml. Se agregó lentamente acetona fría en
15 un volúmen de 100 ml (proporcionando una concentración fi-
nal de acetona de 33,3%), con agitación. Se continuó la
agitación durante 1 hora a 4°C y luego se centrifugó la
mezcla durante 15 minutos a 15.000 rpm. Se decantó el so-
brenadante y se descartó, mientras que el material precipi-
20 tado se disolvía en aproximadamente 30 ml de agua desioni-
zada y se transfería a un frasco volumétrico de 50 ml. El
volúmen de éste se completó hasta 50 ml con agua desioniza-
da y luego se determinaron la actividad de la glucosa iso-
merasa y el contenido total de sacáridos de esta solución.
25 Se halló que el régimen de recuperación era de 97,59% para
la glucosa isomerasa, mientras que el régimen de recupera-
ción de los sacáridos totales era de 11,63%. La cantidad de
sacárido total por unidad de actividad de glucosa isomerasa
fué de 2,93 (γ /U).

30 A continuación, 10 ml de Amberlite IRA-904 húmeda

1 se empaquetaron en una columna de 1,6 x 20 cm y luego 12
ml (conteniendo 3.221 U de glucosa isomerasa) de la solu-
ción enzimática preparada tal como se describe más arriba
tratando la solución de glucosa isomerasa T con acetona en
5 una concentración de 33,3% en volúmen fueron suministrados
a esta columna y se hicieron circular a través de la misma
durante la noche a un régimen de flujo de BVH 1 y a tempe-
ratura ambiente. 100% de la actividad de glucosa isomerasa
suministrada fué adsorbida por esta columna de Amberlite
10 IRA-904.

EJEMPLO 8

Se empleó la solución de glucosa isomerasa T pre-
parada en el Ejemplo 6 y se colocaron 200 ml (conteniendo
15 13.754 U de glucosa isomerasa y 337,76 mg de sacáridos), en
un frasco de 400 ml. Se agregó lentamente etanol frío en un
volúmen de 135 ml (proporcionando una concentración de eta-
nol final de 40,3%) mientras se agitaba. Se continuó la
agitación durante 1 hora a 4°C y luego se centrifugó la
20 mezcla durante 15 minutos a 15.000 rpm. Se decantó el so-
brenadante y se descartó, mientras se disolvía el material
precipitado en aproximadamente 30 ml de agua desionizada y
se transfería a un frasco volumétrico de 50 ml. El volúmen
de este se completó hasta 50 ml con agua desionizada y lue-
25 go se determinaron la actividad de la glucosa isomerasa y
el contenido total de sacárido. Se halló que el régimen de
recuperación de la glucosa isomerasa era de 98,52%, mien-
tras que el régimen de recuperación de los sacáridos tota-
les era de 12,03%. La cantidad de sacárido total por unidad
30 de actividad de glucosa isomerasa fué por lo tanto 3,00

1 (T/U).

5 A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberlite IRA-904 húmeda en una columna de 1,6 x 20 cm y luego 12 ml (conteniendo 3.252 U de glucosa isomerasa) de la solución enzimática preparada tal como se describe más arriba tratando la solución de glucosa isomerasa T con etanol en una concentración de 40,3% en volúmen, fueron suministrados a esta columna y se hicieron circular a través de la misma durante la noche a un régimen de flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente. 100% de la actividad de glucosa isomerasa suministrada fué adsorbida por esta columna de Amberlite IRA-904.

EJEMPLO 9

15 Se empleó la solución de glucosa isomerasa T preparada en el Ejemplo 6 y 200 ml (conteniendo 13.754 U de glucosa isomerasa y 337,76 mg de sacáridos) se colocaron en un frasco de 400 ml. Se agregaron 70,2 g de sulfato de amonio (proporcionando una concentración final de sulfato de amonio de 55% de saturación) a esta solución enzimática
20 mientras se agitaba. Se continuó la agitación durante una hora a 42°C y luego se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante se descartó mientras que el material precipitado se disolvía en aproximadamente 30 ml de agua desionizada y se transfería a un frasco volumétrico de 50 ml. El volúmen de éste se completó hasta 50 ml
25 con agua desionizada y luego se determinaron la actividad de glucosa isomerasa y el contenido total de sacárido de esta solución. Se halló que la recuperación de la glucosa isomerasa era de 95,28%, mientras que la recuperación de los sacáridos totales era de 7,35%. La cantidad de sacárido to-

1 -tal por unidad de actividad de glucosa isomerasa era de
1,89 (γ/U).

5 A continuación, se empaquetaron 10 ml de Amberlite
IRA-904 húmeda en una columna de 1,6 x 20 cm y luego 12
ml (conteniendo 3.145 U de glucosa isomerasa) de la solu-
ción enzimática preparada tal como se ha descrito más arri-
ba tratando la solución de glucosa isomerasa T con sulfato
de amonio en una concentración que proporcionaba 55% de sa-
turación, fueron suministrados a esta columna y se hicieron
10 circular a través de ella durante la noche a un régimen de
flujo de BVH 1 y a temperatura ambiente. 100% de la activi-
dad de glucosa isomerasa suministrada fueron adsorbidos por
esta columna de Amberlite IRA-904.

15 Ejemplo Comparativo 2

Se empleó la solución de glucosa isomerasa T pre-
parada en el Ejemplo 6, y se colocaron 200 ml (conteniendo
13.745 U de glucosa isomerasa y 337,76 mg de sacáridos) en
un frasco de 1 litro. Se agregó lentamente isopropanol frío
20 a éste en un volumen de 400 ml (proporcionando una concen-
tración final de isopropanol de 66,7%) mientras se agitaba.
Se continuó la agitación durante 1 hora a 4°C y luego se
centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 15.000 rpm. Se
decantó y descartó el sobrenadante mientras que el mate-
25 rial precipitado se disolvía en aproximadamente 30 ml de
agua desionizada y se transfería a un frasco volumétrico
de 50 ml. El volumen de éste se completó hasta 50 ml con
agua desionizada y luego se determinaron la actividad de la
glucosa isomerasa y el contenido total de sacárido de esta
30 solución. Se halló que la recuperación de la glucosa isome-

1 -rasa era de 98,47%, mientras que la recuperación de los sa-
cáridos totales era de 73,0%. La cantidad de sacárido to-
tal por unidad de actividad de glucosa isomerasa era de
18,21 (γ/U).

5 A continuación, 10 ml de Amberlite IRA-904 húme-
da se empaquetó en una columna de 1,6 x 20 cm y luego 12
ml (conteniendo 3.250 U de glucosa isomerasa) de la solu-
ción enzimática preparada tal como se ha descrito más arri-
ba tratando la solución de glucosa isomerasa T con isopro-
panol en una concentración de 66,7% en volúmen, fueron su-
ministrados a esta columna y se hicieron circular a través
10 de la misma durante la noche a un régimen de flujo de BVH 1
y a temperatura ambiente. 46,3% de la actividad de glucosa
isomerasa suministrada fueron adsorbidos por esta columna
15 de Amberlite IRA-904.

Ejemplo de Referencia 1

Se empleó la glucosa isomerasa inmovilizada de
acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, 10
20 ml (húmedos) de éstas se empaquetó en una columna (1,6 x
20 cm). La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C.

A continuación, una solución de glucosa al 50%
conteniendo $MgCl_2$ 0,002M en un pH de 8,5 se hizo pasar con-
tínuamente a través de la columna (inicialmente a BVH 3,5)
25 y se recogió el efluente. El contenido de fructosa del
efluente inicial (contra DS) fué de 45%. El régimen de flu-
jo (BVH) disminuyó gradualmente para mantener este nivel de
contenido de fructosa. Después de 20 días, el régimen de
flujo había alcanzado 50% del BVH original.

1 Ejemplo de Referencia 2

Se empleó la glucosa isomerasa inmovilizada preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 6, y 10 ml (húmedos) de ésta se empaquetó en una columna (1,6 x 20 cm). La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C.

5 A continuación, una solución de glucosa al 50% conteniendo $MgCl_2$ 0,002 M con un pH de 8,5 se hizo pasar continuamente a través de la columna (inicialmente a BVH 3,8), y se recogió el efluente.

10 El contenido de fructosa del efluente inicial (contra DS) fué de 45%. El régimen de flujo (BVH) disminuyó gradualmente para mantener este nivel de contenido de fructosa. Después de 22 días, el régimen de flujo había alcanzado 50% del BVH original.

15 Ejemplo de Referencia 3

Se empleó la glucosa isomerasa inmovilizada preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 9, y 10 ml (húmedos) de éste se empaquetó en una columna (1,6 x 20). La temperatura de la columna se mantuvo a 70°C.

20 Una solución de glucosa al 50% conteniendo $MgCl_2$ 0,002 M y con un pH de 8,5 se hizo pasar continuamente a través de la columna (a un régimen de flujo inicial de BVH 6) y se recogió el efluente.

25 El contenido de fructosa del efluente inicial fué de 45% (contra DS). El régimen de flujo disminuyó gradualmente para mantener este nivel de contenido de fructosa. El régimen de flujo había alcanzado 50% del BVH original después de 6 días.

- 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 método para la producción de enzima inmovilizada que comprende: (a) obtener una preparación enzimática que contiene polisacárido inhibidor de adsorción; (b) separar dicho polisacárido de dicha preparación enzimática; y luego (c) poner en contacto la solución de enzima purificada resultante con un portador de adsorción para inmovilizar enzimas sobre el mismo.

2ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo a partir del cual se obtiene la preparación produce y retiene dicha enzima substancialmente intracelularmente.

3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la enzima es glucosa isomerasa.

4ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la preparación enzimática se obtiene a partir del microorganismo Streptomyes.

5ª.- El método de la reivindicación 4ª, en el que el microorganismo es Streptomius olivochromogenes.

6ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la solución enzimática purificada se prepara poniendo en contacto la preparación cruda con una resina de intercambio iónico que adsorbe selectivamente y elimina polisacárido.

1 7ª.- El método de la reivindicación 6ª, en el que
la resina de intercambio iónico está seleccionada del gru-
po que consiste en una resina de intercambio aniónico fuer-
temente básica (tipo I); una resina de intercambio aniónico
5 fuertemente básica (tipo II); una resina de intercambio
aniónico moderadamente básica, o una resina de intercambio
aniónico débilmente básica.

 8ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el
que la solución enzimática purificada se prepara combinan-
do la preparación con un solvente orgánico en una concen-
10 tración en la cual la enzima se precipitará selectivamente
para separar dicha enzima, y luego redissolver dicha enzima.

 9ª.- El método de la reivindicación 8ª, en el que
el solvente orgánico está seleccionado del grupo que consis-
15 te en metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, ace-
tona, p-dioxano y mezclas de los mismos.

 10ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el
que la preparación enzimática purificada se obtiene combi-
nando la preparación cruda con una sal en una concentración
20 en la cual la enzima se precipita selectivamente para sepa-
rar dicha enzima, y redissolver luego dicha enzima.

 11ª.- El método de la reivindicación 10ª, en el
que la sal está seleccionada del grupo que consiste en sul-
fato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio y
25 mezclas de los mismos.

 12ª.- El método de la reivindicación 3ª, en el
que el portador es una resina de intercambio iónico.

 13ª.- Un método para la producción de una enzima
inmovilizada.

30 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-

1 -cede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

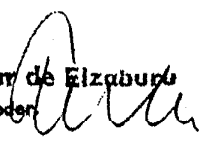
Esta Memoria consta de cincuenta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 04. MAY 1979

P.A.

Oscar de Elzaburu
Por Poder



10

15

20

25

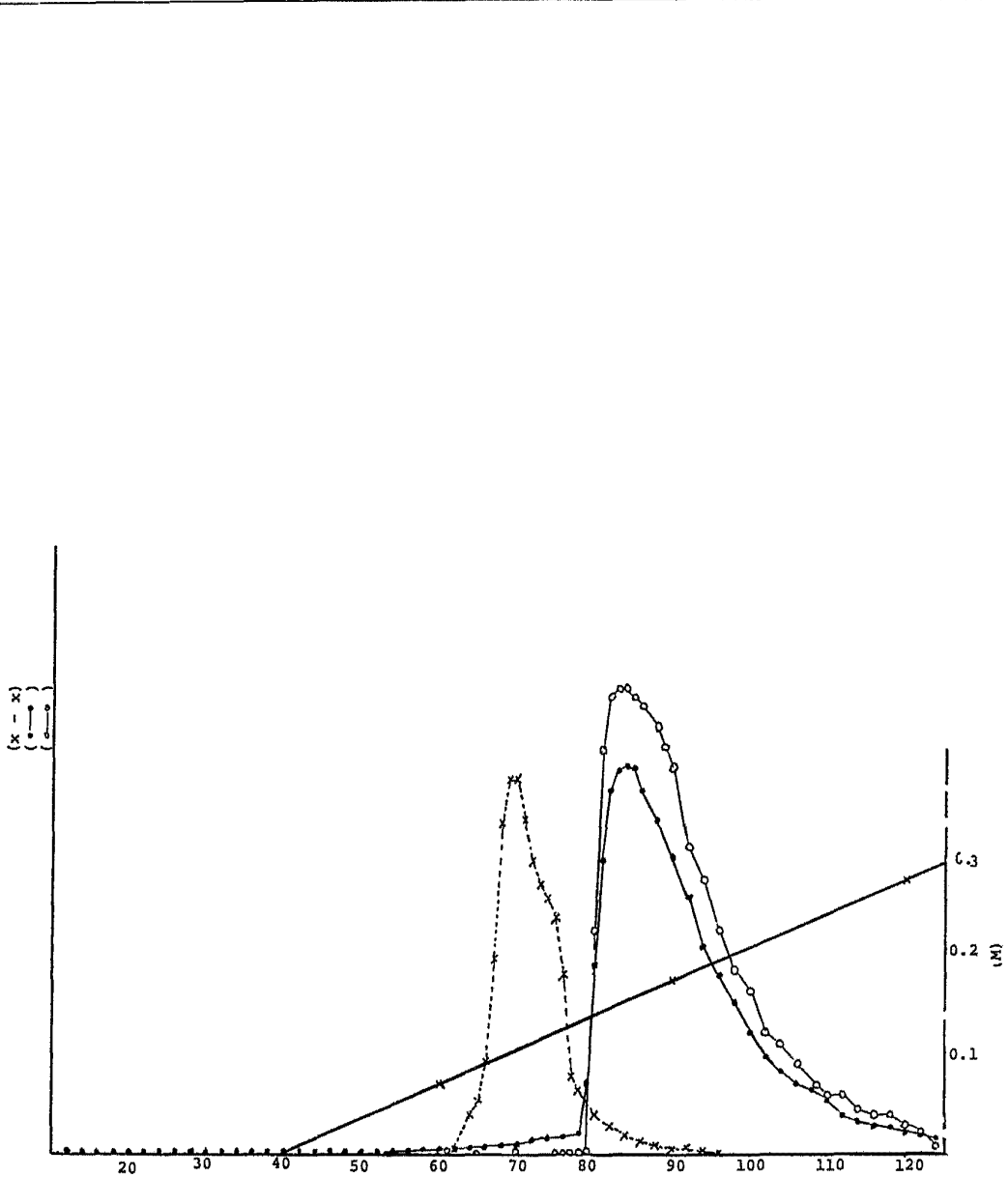


Fig. 1

Oscar de Elizaburu
Por Poder.