



14

bb

P.- 31.468

14 ABR. 1966

32 4382

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 18 de marzo de 1.966, con el núm. 324.382.

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, entidad japonesa, establecida en 1,3-chome, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón, por:

"UN METODO PARA FABRICAR JARABE QUE CONTIENE FRUCTUOSA A PARTIR DE GLUCOSA"

La presente invención se refiere a un método de isomerización de glucosa en jarabe de fructuosa por medio del empleo de una enzima isomerizadora de glucosa.

Como métodos para convertir glucosa en fructuosa, en la técnica anterior se conocen, hasta ahora, el método alcalino y el método enzimático, etc; no obstante, ambos métodos son todavía algo difíciles de aplicar en usos prácticos. Es decir, el primer método da más pérdidas a causa de la descomposición de la glucosa, mientras que el último método tiene a su vez el inconveniente de que el medio que contiene xilosa, que es considerablemente costoso, es necesario en la mayo-

5

10

324382

14 AD



ría de los casos para producir la enzima por medio del cultivo del microorganismo.

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar, por medio del empleo de un método enzimático, un procedimiento nuevo y económico para producir un jarabe que contiene fructuosa que tiene una dulzura equivalente al azúcar invertido, convirtiendo glucosa en fructuosa.

10 Particularmente, esta invención se refiere a un método en el que una disolución de glucosa o disolución que contiene glucosa, que se ha hecho reaccionar con enzima isomerizadora de glucosa derivada de un microorganismo que asimila xilano a través de un cultivo en el medio que contiene xilano o materiales que contienen xilano, se convierte en jarabe que contiene fructuosa.

15 En la naturaleza, la xilosa existe como xilano (bien enteramente o casi enteramente de unidades de xilosa), que consiste en un ingrediente principal de hemicelulosa, en todas las plantas de tierra firme. Dicha xilosa se fabrica a escala comercial por medio de la hidrólisis ácida del xilano.

20 Por otro lado, es sabido que en ciertos microorganismos se observa una enzima que es capaz de hidrolizar xilano. A este respecto, puede fabricarse enzima isomerizadora de glucosa si el microorganismo se cultiva en el medio que contiene xilano. En este sentido, los autores de la invención han desarrollado investigaciones acerca de un microorganismo, y han descubierto que un miembro de *Streptomyces* genus se desarrolla perfectamente en el medio que contiene xilano, y, además, los autores de la invención están convencidos de que se produce enzima isomerizadora de glucosa. Además, en la fabricación
25 de enzima isomerizadora de glucosa a partir del *Streptomyces* genus, tal como por ejemplo, el *Streptomyces* sp., cepa YT-Nº 4,
30

324382

14 AB



5 no es necesario emplear un medio tal que contenga xilano puro, sino cualquier sustancia que contenga xilano disponible, tal como paja, salvado de trigo, mazorca de maiz, vaina de maiz, salvado de arroz y desperdicios o residuos de pasta, y aún así se fabrica una cantidad considerable de enzima isomerizadora de glucosa.

10 Por consiguiente, sería mucho más económico que el xilano se asimilase con Streptomyces genus que forma enzima isomerizadora de glucosa, que el empleo del medio convencional que contiene xilosa.

15 Por otra parte, no puede fabricarse enzima isomerizadora de glucosa aun cuando, en lugar del xilano, se aplicase cualquier hidrato de carbono diferente al xilano, tal como glucosa, galactosa, manosa o fructuosa, como fuente de carbono del medio.

20 Además, la enzima isomerizadora de glucosa fabricada según la presente invención tiene superiores características para su aplicación comercial. En realidad, la enzima tiene un pH óptimo próximo a 7; no obstante, puede aplicarse en el intervalo de pH entre 5'5 y 8'0.

La presente enzima es aplicable, además, de un modo efectivo, a una disolución de glucosa incluso a concentración elevada.

25 Más aún; la presente enzima puede convertir aproximadamente el 50% de la glucosa inicial en fructuosa, con lo que a partir de la glucosa puede prepararse un jarabe que tiene una composición y dulzura equivalentes al azúcar invertido.

30 La característica principal de la presente invención es proporcionar un método económico de fabricación de la enzima isomerizadora de glucosa, gracias al empleo en el medio de ma-

324382

14



terial que contiene xilano; en lugar del empleo de xilosa.

Además, la presente enzima convierte la glucosa en fructuosa de un modo efectivo, ya que dicha enzima mantiene estables las propiedades con vistas a su aplicación comercial.

5 A continuación se describe en detalle la presente invención con los ejemplos reales.

Ejemplo 1.

10 Se inocula *Streptomyces* sp., cepa YT-Nº 4 en un medio de 400 ml, que consta de 3% de salvado de trigo (que tiene 21% de xilano), 4% de extracto de maíz en maceración, 0'1% de SO_4 Mg. $\text{7H}_2\text{O}$ y 0'3% de ClNa , que se esterilizó previamente, y se cultivaron a 30°C durante 20 a 30 horas por agitación.

15 Después, la siembra mencionada anteriormente se trasplanta a un medio de 10 l que consta de la composición anterior y después se cultiva bajo aireación en un fermentador Jar (velocidad de aireación, 7'5 l/min; 200 rpm; 30°C).

20 La actividad de la enzima isomerizadora de glucosa en las células llega a un máximo en 20 a 25 horas. Se llevó a cabo un ensayo de determinación de la actividad de la enzima isomerizadora de glucosa, por medio de la siguiente mezcla de reacción:

25 Disolución tamponadora de fosfato
0'2M (pH 7'5)..... 0'5 ml.
Disolución de glucosa 1M..... 0'2 ml.
Disolución 0'1M de SO_4 Mg. $\text{7H}_2\text{O}$ 0'1 ml.
Disolución de enzima..... 0'2-0'3 ml.

30 Después de haber hecho reaccionar las sustancias anteriores a 70°C durante una hora con 2 ml. de volumen total de la misma con adición de agua, dicha reacción se interrumpe añadiendo ácido perclórico 0'5M, y se hace una estimación de la fructuosa por medio de una modificación del método de la

324382

14 ABR



cisteína-carbazol, después de una adecuada dilución.

Se define como una unidad de la enzima la cantidad de enzima que produce 1 mg. de fructuosa a partir de glucosa, durante una hora y a 70°C, y en las condiciones de ensayo anteriores.

5

A partir de 50 ml. de la anterior disolución de cultivo se recoge la célula por centrifugación, que después se lava con agua y se trata por medio de un oscilador sónico, durante 15 minutos a 10 Kc, después de haber sido suspendido en agua. Después del tratamiento sónico se obtienen 30 ml. de líquido que sobrenada, y se emplea después como una fuente de enzima. Su actividad es de 623 unidades.

10

A dicha disolución de enzima se añaden 50 g. de glucosa, 5 ml. de 50 Mg. $7H_4O_2$ 0'1M, 25 ml. de disolución tamponadora de fosfato 0'2 M (pH 7'5) y agua, y el volumen total de la misma se completa hasta 100 ml. con agua, y dicha mezcla se incuba a 65°C durante 50 horas ajustando el intervalo de pH entre 6'8 y 7'2 durante la reacción.

15

Una vez finalizada dicha reacción, el precipitante se separa por centrifugación, y el líquido que sobrenada se trata por medio de una resina cambiadora de iones para separar las sales inorgánicas y las proteínas, y se evapora por vacío.

20

Así pues, por el tratamiento anterior se obtiene un jarabe transparente que tiene suficiente dulzura, y que consta de 54% de glucosa y 46% de fructuosa. De dicha mezcla se separa, por medio del método convencional, el complejo de fructuosa y calcio, añadiendo lechada de cal.

25

La fructuosa obtenida a partir de la misma se decolora posteriormente, y cristaliza después de un procedimiento de concentración que se consigue disminuyendo la presión. Se obtienen 11 g. de fructuosa.

30

324382

14 AB



Después se consigue la muestra de la misma con cromatografía de papel empleando un disolvente tal como fenol: agua (4:1), piridina: butanol: agua (4:6:3). Como agente detector se emplea reactivo de resorcina, que es específico para la cetosa.

Del resultado anterior se ha deducido que el índice de Rf de la misma corresponde exactamente con el índice de Rf de la fructosa comparativa. Además, la polarización rotatoria de la misma era exactamente igual que el valor de la fructosa de comparación.

Ejemplo 2

Se describirá un caso en el que se emplea xilano puro como fuente de carbono del medio.

En este ejemplo se han empleado *Streptomyces flavovirens*, *Streptomyces echinatus*, *Streptomyces achromogenus* y *Streptomyces* sp., cepa YT- N° 4.

Estos microorganismos se preparan para su cultivo en un medio de 50 ml. que contiene 1% de polipeptona, 0.3% de PO_4HK_2 , 0.1% de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.5% de xilano, a 30°C, por agitación después de su inoculación.

Después del cultivo, las células se recogen por centrifugación y, después de lavarlas con agua, dichas células recogidas se ponen en suspensión en agua para tratarlas con el oscilador sónico durante 15 minutos a 10 kc. Después del tratamiento sónico, se obtiene un líquido que sobrenada (20 ml), que se emplea después como disolución de enzima.

Los resultados de las determinaciones de su actividad se muestran en la Tabla siguiente.



Cultivos	Azúcar inicial (g/50 ml)	Azúcar restante (g/50 ml)	Actividad de la enzima (unidades)	Proteína de la célula (mg)	Tiempo de cultivo (horas)
5 St. flavovirens	0'25	0'20	10'0	66'4	14
St. echinatus	0'25	0'19	32'8	82'3	22
St. achromogenus	0'25	0'16	41'2	76'8	10
St. sp. cepa YI-Nº 4	0'25	0'07	122'8	86'4	34

10

La actividad de la enzima especificada en la Tabla 1 indica las cantidades de fructosa producida cuando 80 ml. de disolución 0'1M de glucosa se hacen reaccionar, a 70°C y durante una hora, con el total de la disolución anterior de enzima.

15

Aunque pueden aparecer algunas diferencias en la actividad, todas las cepas producen enzima isomerizadora de glucosa que asimila xilano.

Ejemplo 3

20

Se describirá ahora el resultado de una reacción de isomerización realizada a varios pH empleando la disolución de enzima que se preparó de una forma similar de acuerdo con el ejemplo 1.

25

Composición de la disolución reaccionante: 18 g. de glucosa. 25 ml. de disolución tamponadora de fosfato 0'2M para varios pH (solamente se empleó disolución tamponadora M/10 de glicina-NaOH (25 ml.) en el caso de pH 9). 5 ml. de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ 0'1M, disolución de enzima (260 unidades).

30

Después de que el pH de la mezcla respectiva de las sustancias anteriores se ajusta a 5'0, 5'5, 6'0, 6'5, 7'0, 8'0 y 9'0, el volumen total se completa hasta 100 ml. con agua, y la mezcla respectiva se hace reaccionar a 65°C durante 50 horas. El pH de las mismas se ajusta cada 6 horas empleando

324382

14 ABB



NaOH. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tiene lugar una isomerización distinta de la reacción de la enzima cuando el pH de la reacción está en el lado alcalino, y la Tabla 3 muestra los valores de fructosa deducida, producida por medio de una reacción sin enzima.

5

De los resultados anteriores se deduce que el pH aplicable ha de estar en el intervalo de 5'5 a 8'0.

TABLA 2

Horas de reacción	Reacción (pH)						
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	9.0
20	-	-	3.5g.	5.1g	6.8g	7.1g	7.5g
50	1.9g	2.7g	5.4g.	7.5g	10.0g	9.3g	8.9g

15

Los valores anteriores indican la cantidad (g) de fructosa formada a partir de glucosa.

TABLA 3

Horas de reacción	Reacción (pH)						
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	9.0
20							
50	1.9g	2.7g	5.4g	6.8g	9.0g	3.9g	2.1g

Los valores anteriores indican la cantidad (g) de fructosa formada a partir de glucosa.

25

Ejemplo 4

En este ejemplo se describirán los resultados de varias reacciones llevadas a cabo a temperatura variable, fijando el pH de reacción entre 6'8 y 7'2.

30

La disolución de enzima se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.



324382

Composición de la disolución reaccionante:

- Glucosa..... 18'0 g.
- Disolución tamponadora de Fosfato 0'2M 25 ml.
- SO Mg.⁷H O 0'1M 5 ml.
- 5 Disolución de enzima (433 unidades).

El volumen total de la mezcla se completó en agua hasta 100 ml. La reacción se ha llevado a cabo respectivamente a varios intervalos de temperatura, tales como a 40°C, 45°C, 50°C., 60°C., 70°C., y 80°C., ajustando el pH a 6'8-7'2 cada 10 12 horas empleando NaOH.

Los resultados se muestran en la tabla 4.

Por los resultados anteriores se ha comprobado que la presente enzima es capaz de reaccionar a una temperatura increíblemente elevada, loque significa que la presente enzima tiene superior estabilidad al calor. Sin embargo, el 15 intervalo de temperaturas aplicable adecuado de la enzima está comprendido entre 45 y 80°C, ya que una temperatura de reacción que exceda de 80°C puede favorecer la aparición de color, debida a la descomposición térmica del azúcar.

20

TABLA 4

Horas de reacción	Temperatura de reacción (°C)						
	40	45	50	60	65	70	80
20	2.2g	2.8g	4.0g	6.0g	8.5g	8.6g	8.9g
25 44	4.6g	5.5g	7.0g	8.3g	8.9g	8.9g	8.8g

Los valores anteriores muestran las cantidades (g) de fructosa formada a partir de glucosa.

Ejemplo 5

30

En este caso se han obtenido varios resultados, a los que se ha llegado fijando el pH y la temperatura en



324382

6'8-7'2 y 65°C, respectivamente, y llevando a cabo la reacción a varias concentraciones de glucoosa.

Las distintas concentraciones de glucosa aplicadas a este ejemplo eran 18%, 36%, 50%, 60% y 70%.

5 La composición de la disolución de reacción se prepara según la forma que se indica en la Tabla 5, y la disolución de enzima se preparó según el procedimiento del ejemplo 1 anterior.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

10 Por los resultados anteriores, que se indican en la Tabla 6, se ha comprobado que la presente reacción de isomerización para producir fructosa progresa incluso a una elevada concentración de la disolución de glucosa.

TABLA 5

15	Concentración de glucosa	18%	36%	50%	60%	70%
	Glucosa (g)	18	36	50	60	70
	Disolución tamponadora de fosfato 0'2M	20	20	20	20	20
20	SO ₄ Mg.7H ₂ O 0'1M	5	5	5	5	5
	CL ₂ Co.6H ₂ O 0'2M	1	1	1	1	1
	Disolución de enzima (unidades)	307	307	307	307	307
25	Volumen de reacción	100	100	100	100	100

324382

14



TABLA 6

Horas de reacción	Concentración de glucosa					
	18%	36%	50%	60%	70%	
5	20	8.5g	13.2g	15.8g	17.8g	17.1g
	48	9.5g	18.2g	24.0g	25.6g	29.6
	70	9.6	19.0	25.5	28.2	32.0
	92	9.6	19.5	26.0	31.2	34.9
10	Relación de conversión después de 92 horas de reacción	53.3%	54.2%	52.0%	52.0%	49.9%

Los valores indican cantidad(g) de fructosa formada a partir de glucosa.

15: Ejemplo 6

Un medio de siembre (50 ml.) que contiene 1% de xilosa, 1% de polipeptona, 0.3% de PO_4HK_2 y 0.1% de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se introduce en un Kolbe, y se inocula cepa YT-Nº 4 de *Streptomyces* sp., después de haber sido esterilizada, y se cultiva a 30°C durante tres días.

20 Después se aplica dicho cultivo como siembre en el experimento presente. El pH del medio para fabricar la enzima, que contiene 5% de salvado de arroz, 3% de licor de maceración de maíz, y 0.1% de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se ajusta a 7.0. Se toman 100 ml. del medio en el Kolbe de 500 ml., y se esterilizan. Después se le inoculan 4 ml. de la siembra anterior, y se cultiva a 30°C durante 30 horas por agitación.

25 La disolución de enzima preparada a partir de 50 ml. de este cultivo tiene un valor de 700 unidades.

30 Las células cultivadas se recogen después por cen-

324382

14 ABR



trifugación, y después dichas células recogidas se suspenden en agua y se destruyen empleando un oscilador sónico a 10 Kc durante 15 minutos.

5 Después se centrifugan las células destruidas y el líquido que sobrenada que resulta se emplea como fuente de enzima. Dicha disolución de enzima se hace reaccionar con 200 g. de glucosa de la misma forma que en el ejemplo anterior.

Como resultado, se convirtieron en fructosa 200 g. (49'5%) de glucosa empleada como sustrato de la enzima.

10 Después de desproteínizarla, se emplearon carbón activo y resina cambiadora de iones para purificar la anterior disolución de reacción, y después se concentró hasta un contenido de agua de 25%.

15 La cantidad producida fué de 195 g. en forma de sustancia anhidra.

Ejemplo 7

En este ejemplo, se describen los resultados experimentales de ensayos en los que se emplean vaina de maíz y mazorca de maíz como fuentes de xilano.

20 El medio (50 ml, pH 7'5) que contiene 4% de licor de maceración de maíz, 0'1% de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0'025% de $\text{CL}_2\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3% de vaina de maíz o 3% de mazorca de maíz sólidos hasta una malla de 131 micras de abertura, se coloca en un Kolbe de 200 ml. de capacidad, y se inocula cepa YT-Nº 5 de 25 *Streptomyces* sp., después de haber sido esterilizado.

Una vez cultivado el medio anterior a 30°C durante 48 horas por agitación, se preparó la disolución de enzima según la forma anterior.

30 En la Tabla 7 se dan las actividades estimadas de la enzima isomerizadora de glucosa.

TABLA 7

Fuente de xilano	Actividad de la enzima (unidades)
Ninguna	24.5
Vaina de maíz	481.0
Mazorca de maíz	320.5

5

Se produce enzima isomerizadora de glucosa aun cuando se empleen vaina de maíz y mazorca de maíz como fuente de xilano.

Ahora, a la disolución de enzima (481 unidades) que se obtuvo en el procedimiento en que se empleó vaina de maíz como fuente de xilano, se añaden 100 g. de glucosa anhidra, 50 ml. de disolución tamponadora de fosfato 0.2M (pH 7.5) y 10 ml. de SO_4^{2-} Mg. 7H₂O 0.1M. El volumen total se completa con agua hasta 200 ml. Después, dicha mezcla se incuba a 70°C.

Durante dicha reacción, el pH de la misma se ajusta en el intervalo comprendido entre 6.8 y 7.2 utilizando NaOH.

Después de 90 horas, se convirtió en fructosa el 43.5% de la glucosa.

Después de la reacción citada, se desproteíniza la disolución que se ha hecho reaccionar, y dicha disolución se purifica posteriormente empleando carbón activo y resina cambiadora de iones, y la disolución se concentra hasta un contenido de agua de 25%.

La producción obtenida a partir del procedimiento anterior fué de 98.0 g. en forma de una sustancia anhidra.

Ejemplo 8

En este ejemplo se describe el caso en que se emplean como sustratos de la enzima las aguas madres (hidrol) obtenidas en la primera cristalización de un hidrolizado de almidón.

30

324382



Un medio que contiene 3% de salvado de trigo, 4% de licor de maceración de maíz, 0.1% de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.025% de $\text{Cl Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se ajusta a pH 7.0 empleando NaOH. Después se recogen en un Kolbe de 500 ml. 100 ml. del medio anterior.

5 Una vez esterilizado, se inoculan 4ml. de la disolución del medio (cepa YT-Nº 5 de *Streptomyces* sp.) que fué cultivado con el cultivo de siembra del ejemplo 6 anteriormente mencionado. Después se cultiva a 30°C durante 48 horas por agitación.

10 La disolución de enzima preparada a partir de 50 ml. de caldo de cultivo tiene 760 unidades. Recogiendo por centrifugación las células cultivadas en el caldo de 50 ml., dichas células obtenidas a partir del procedimiento anterior se emplean como fuente de enzima, después de lavadas. Como
15 sustrato de la enzima para el procedimiento de isomerización, se aplican aguas madres (hidrol) de D.E. 87.

A 100 g. de aguas madres (hidrol) se añaden enzima, $\text{Mg}(\text{OH})_2$.M/400 y $\text{Cl Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.M/1000, y el volumen total se completa hasta 200 ml. con agua, después de ajustar el pH a 7.2.
20 Después se incuban a 70°C. Durante la reacción, el pH de la misma se ajusta en el intervalo comprendido entre 6.8 y 7.2.

Después de 50 horas, se convierte en fructosa el 45% de la glucosa. Sacando las células de la disolución reaccionante, dicha disolución reaccionante se purifica empleando
25 carbón activo y resina cambiadora de iones, y se concentra hasta que el contenido de agua llega a 25%.

La composición del producto es de un 26% de fructosa, 31.8% de glucosa, 17.2% de oligosacárido y un contenido de agua del 25%.

30

Ejemplo 9

Un medio de siembra que tiene una composición tal que consta de 1% de xilosa, 1% de polipeptona, 0'3% de $PO_4^{H_2}$ y 0'1% de $SO_4^{Mg.7H_2O}$, se coloca en un Kolbe y se esteriliza. En este medio se inocula después cepa YT-Nº 4 de *Streptomyces* sp. y se cultiva a 30°C durante 48 horas.

5

A continuación, y como operaciones intermedias para el cultivo, se realiza un cultivo en un medio de 50 l. y, después, un cultivo en un medio de 500 l. para aumentar la producción de células; finalmente, dichas operaciones llegan a un medio de cultivo principal de 5.000 l.

10

La composición del medio aplicado en la presente operación, exceptuando el medio de siembra, es de 3% de salvado de trigo, 4% de licor de maceración de maíz, 0'1% de $SO_4^{Mg.7H_2O}$ y 0'025% de $Cl_2Co.6H_2O$.

15

El pH del medio anterior se ajusta a 6'5 empleando NaOH, y después se esteriliza dicho medio.

El procedimiento de cultivo se realiza bajo condiciones tales como 30°C, 1/3 de volumen de aireación del caldo por minuto, y agitación a 200 rpm. Después de 24 horas alcanzó un máximo la actividad de las células.

20

La disolución de enzima preparada a partir del caldo de 50 ml. tenía 750 unidades. Después del procedimiento anterior, se separa menos salvado de trigo contenido en el caldo, empleando un tamiz de malla. Las células se recogen empleando un filtro-prensa, con lo que se obtuvieron 1000 kg de células. Las células recogidas se suspenden después en agua.

25

Las células en suspensión se destruyen empleando un homogeneizador de alta presión, y las células destruídas se emplean como fuente de enzima. Como sustrato de isomeri-

30

324382

14 APR



zación se ha empleado jarabe de almidón convertido de D.E. 92'5 en una concentración de 50% (que consiste en 87% de glucosa, y oligosacárido que contiene 13% de disacárido).

5 Se toman 15.000 Kg (como materia sólida) del jarabe de almidón convertido anterior se introducen en un depósito de isomerización que tiene una capacidad de 30 m³, y se añaden Mg(OH)₂ .M/400 y fuente de enzima, después de haber sido calentado hasta 65°C. Después, la temperatura y el pH durante la isomerización se han mantenido, respectivamente, en 65°C y 10 en aproximadamente 7'0 empleando NaOH.

En el dibujo se muestran las relaciones de conversión, el control de temperatura y el control de pH durante el procedimiento de isomerización.

15 Después de 90 horas, la relación de conversión llegó a aproximadamente el 45%, y la disolución que se había hecho reaccionar se purificó después empleando carbón activo y resina cambiadora de iones, como en el procedimiento convencional de purificación. Después se fabricó producto final, después de concentrado hasta un contenido de agua del 25%.

20 El rendimiento de producto fabricado fué de 19.600 kg.

El resultado del análisis del mismo día 29'6% de fructosa, 36% de glucosa, 9'4% de oligosacárido que contiene disacárido, y un contenido de agua de 25%.

Ejemplo 10

25 Según las operaciones descritas en el ejemplo anterior 9, se realizan, uno después de otro, un cultivo de siembra, un cultivo intermedio y un cultivo principal.

30 El medio tiene una composición de 3% de salvado de trigo, 4% de licor de maceración de maíz, 0'1% de SO Mg.7H O₄ y 0'025% de Cl Co.6H O.₂



5 El pH inicial de la operación de cultivo se ajusta a 6'5 empleando NaOH, y el procedimiento de cultivo se lleva a cabo en condiciones tales como 30°C, 1/3 de volumen de aireación del caldo por minuto, y agitación a 200 rpm, después de haber sido esterilizado. Después de 24 horas, la actividad de las células llegó al máximo.

10 La disolución de enzima preparada a partir de 50 ml. del caldo tenía 700 unidades. Después del procedimiento anterior, se separa menos salvado de trigo contenido en el caldo, empleando un tamiz de mallas. Las células se recogen empleando un filtro-prensa, con lo que se obtienen 900 kg. de células. Dichas células recogidas se emplearon como fuente de enzima.

15 Como sustrato de isomerización, se empleó jarabe de almidón convertido de D.E. 97'0 en una concentración del 50%, que consta de 37% de glucosa y 13% de oligosacárido que contiene disacárido).

20 Se toman 15.000 Kg (como sustancia sólida) del jarabe de almidón convertido anterior y se colocan en un depósito de isomerización que tiene una capacidad de 30 m³, ya se añaden al mismo, una vez calentado hasta 65°C, 50 Mg:7H O₄² M/400 y fuente de enzima. Durante la isomerización, la temperatura y el pH se ajustaron a aproximadamente 65°C y aproximadamente 7'0 utilizando NaOH, respectivamente.

25 Después de 100 horas, la relación de conversión llegó a aproximadamente 47%, y la disolución que había reaccionado se purificó después empleando carbón activo y resina cambiadora de iones, como en el procedimiento convencional de purificación. La cantidad de producto obtenido finalmente, 30 después de un procedimiento de concentración hasta el 25% de

324382

14 ABR 1966



agua, fué de 19.500 kg.

El resultado del análisis del producto anterior dió 33'4% de fructosa, 37'7% de glucosa, 3'9% de oligosacárido que contiene disacárido, y un contenido de agua de 25%.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Japón con fecha 11 de Mayo de 1.965 bajo el Núm. 27.525/65 se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

10

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

15

1.- Un método para fabricar jarabe que contiene fructosa a partir de glucosa que está caracterizado porque la solución de glucosa o solución que contiene glucosa es tratada con enzima isomerizadora de glucosa enzimáticamente a 45-80°C con pH comprendido entre 5,5 y 8,0.

20

2.- Un método de producir jarabe que contiene fructosa a partir de glucosa como se reivindica en el punto 1, en el cual la enzima es derivada de cultivo de microorganismo que asimila xilano y que forma enzima isomerizadora de glucosa a través del medio de xilano o de materiales que contienen xilano.

25

3.- Un método de producir enzima isomerizadora de glucosa como se reivindica en los puntos 1 y 2, que está caracterizado porque la enzima isomerizadora de glucosa es derivada de microorganismo que asimila xilano y que forma enzima isomerizadora de glucosa que es cultivado a través

30

14 ABR 1966

324382

del medio de xilano o de materiales que contienen xilano.

4.- Un método de producir jarabe que contiene fructosa a partir de aguas madres (hidrol o verdes), derivadas de un hidrolizado de almidón, quees tratado con enzima isomerizadora de glucosa, como se reivindica en los puntos 1 a 3.

5.- Un método para fabricar jarabe que contiene fructosa a partir de glucosa.

Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, representada por los dibujos que se acompaña y para los fines que se han especificado.

La presente memoria consta de diecinueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 ABR. 1966

P.A.

Alberto de Elizaburu
Per/Pesca

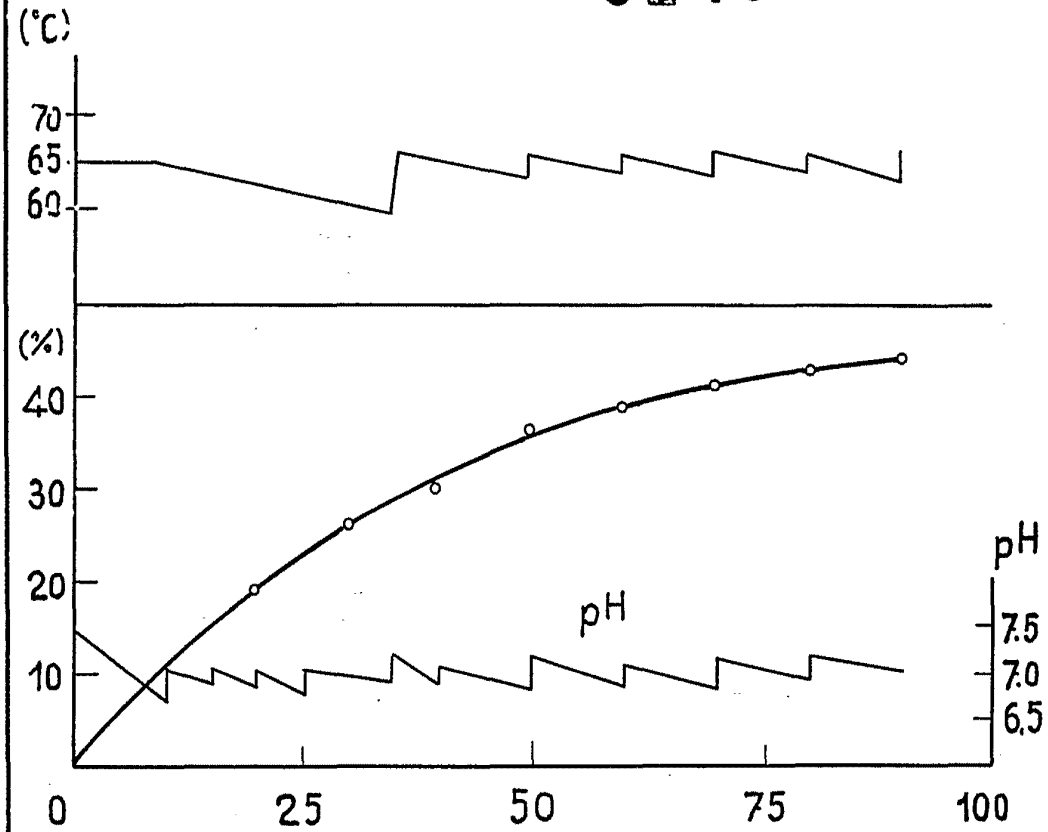
MCC. MEU

324382



14

324382



ESCALA VARIABLE

Alberto de Elzaburu
Por Poder