

Int. Cl.: C12D

3 MAY 1972


402344

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: STANDARD BRANDS INCORPORATED.

RESIDENCIA: 625 Madison Avenue, NEW YORK,
N.Y. U.S.A.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA CONVERSION
ENZIMATICA DE LA GLUCOSA EN FRUCTOSA"

Prioridad: Patente _____ n.º _____ del _____



1

5

10

15

20

25

30

La presente invención se refiere a un procedimiento para la conversión enzimática de una porción de glucosa contenida en una solución de la misma y obtención de fructosa.

Existen muchos procedimientos conocidos en la tecnología para la producción de soluciones que contienen fructosa. Estos procedimientos pueden agruparse en tres categorías generales.

En la primera categoría, la sucrosa se invierte a la glucosa y fructosa mediante el uso de un ácido o invertasa.

En la segunda categoría, la glucosa se convierte en fructosa mediante el uso de catalizadores alcalinos. Existe una gran diversidad de artículos y patentes que describen diferentes catalizadores alcalinos y el uso de los mismos para la conversión de la glucosa en fructosa. Como ejemplos de los procedimientos en que se utilizan los catalizadores alcalinos son de mencionarse los que se describen por ejemplo, en las patentes de los E.U.A. núms. 2,487,121; 2.746.889; 2.354.664, 3.285.776; 3.383.245 y 3.305.395.

Sin embargo, existen diversas desventajas asociadas con la isomerización alcalina. Por ejemplo, debido a la falta de selectividad de los catalizadores alcalinos, se pueden formar algunos subproductos no deseados, tal como grandes cantidades de materiales coloridos y ácidos. Para refinar los licores de la isomerización alcalina con objeto de remover los subproductos no deseados y obtener un producto aceptable se requiere de procedimientos complicados y de alto costo.

La tercera categoría de procedimientos para la



402344

1 producción de soluciones conteniendo la fructosa implica
la conversión enzimática de la glucosa a partir de una solu-
ción que contenga la misma, por ejemplo, jarabe de maiz, en
fructosa. En la teconología correspondiente, se conocen va-
5 rios micro-organismos que producen la isomeraza de glucosa.
Por ejemplo, en un artículo que aparece en Scienc, Vol. 125,
páginas 648-9 (1957), se describe que una enzima derivada de
la Pseudomonas hydrophila isomeriza la glucosa en fructosa.
Asimismo, la patente británica nº. 1.103.394 y la patente
10 japonesa 7428 (1966) de Takasaki et al indica que los micro-
organismos clasificados como pertenecientes al género Streptomyces,
tal como Streptomyces flavovirena, Streptomyces echinatus y Streptomyces albus producen el isomeraza de glu-
cosa. Existen muchos otros micro-organismos que se descri-
ben en la tecnología como productores de la isomeraza de glu-
15 cosa. Algunos otros de estos micro-organismos se describen,
por ejemplo, como pertenecientes a las clases denominadas
Aerobacter cloacae, Bacillus megaterium, Acetobacter suboxydans,
Acetobacter melanogenus, Acetobacter roseus, Acetobacter oxydans,
20 Bacillus fructosa y Lectobacillus fermenti.

Debido a los aspectos económicos implicados en la producción de la isomerasa de glucosa, es de suma importancia utilizar la isomerasa bajo las condiciones en que se logren los rendimientos máximos utilizando las cantidades
25 mínimas de isomerasa de glucosa. Asimismo, las condiciones para la isomerización deben ser tales que se originen las cantidades mínimas de subproductos inadecuados.

La isomerasa de glucosa se produce principalmente de manera intracelular por parte de los micro-organismos
30 anteriores. Siendo así, la mayor parte de la isomerasa de



402344

1 glucosa se encuentra dentro y/o en las paredes celulares
de los micro-organismos. Normalmente, cuando estas células
se utilizan para isomerizar la glucosa en fructosa, la iso-
5 merasa durante la isomerización se libera o se extrae de la
misma; en este caso, la isomerasa de las células se encuen-
tra prácticamente solubilizada. Para la recuperación de la
isomerasa se requiere de un procedimiento complicado y de
alto costo con objeto de que pueda utilizarse en otra reac-
ción de isomerización.

10 En un artículo titulado "Streptomyces Glucose
Isomerase" que apareció en Fermentation Advances (1969),
páginas 561-589, la isomerasa de glucosa derivada de un mi-
cro-organismo perteneciente al género Streptomyces se fija
o estabiliza sobre o dentro de las células. Este tratamien-
15 to de fijación o de estabilización consiste en el calenta-
miento de las células que contienen la isomerasa de gluco-
sa intracelular. La enzima fijada se coloca en una columna
y se hace pasar continuamente una solución de glucosa a
través de la misma. A medida que la glucosa entra en contac-
20 to con la enzima fijada, se produce continuamente la fructo-
sa. Aun cuando el procedimiento descrito en este artículo
representa aparentemente una solución parcial al problema
de reutilización de la isomerasa de glucosa, se realizó a
una escala demasiado pequeña en que los parámetros de tra-
25 tamiento aplicados no resultan adecuados para su empleo en
la práctica comercial. Por lo tanto, sería difícil, si no
es que imposible, reducir este procedimiento a la escala co-
mercial y producir una solución conteniendo la glucosa-fruc-
tosa de calidad apropiada.

30 Siendo así, existe la necesidad de un procedi--



402344

1 miento comercial continuo para la isomerización enzimática
de la glucosa en fructosa.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para la conversión enzimática de la glu-
5 cosa en fructosa, el cual consiste en la formación de una so-
lución conteniendo glucosa cuya viscosidad es de 0,5 á 100
centipoises, pH de 6 á 9 y con una concentración de 5 á 80%
en peso de glucosa; calentamiento de la solución hasta una
10 temperatura de 20° á 80°C y paso de dicha solución a través
de un lecho que contiene las células de micro-organismos que
contienen la isomerasa de glucosa intracelular que ha sido
tratada para inhibir la extracción de la isomerasa de las cé-
lulas que tienen una actividad de isomerasa de glucosa al me-
nos de aproximadamente 3l UIG por centímetro cúbico de lecho,
15 un valor de estabilidad al menos de aproximadamente 50 horas
y una relación de profundidad a ancho al menos cercana a 2,
a una velocidad de flujo en que hasta el 54% en peso de la
glucosa se transforme en fructosa, en que el color de la so-
lución transformada aumente menos de 2 unidades de color y
20 en que no se presente una producción considerable de psicosa.

Los diversos términos y expresiones empleados en lo anterior, así como en la descripción y ejemplos posteriores, se definen como sigue:

VALOR DE ESTABILIDAD

25 El valor de estabilidad se determina colocando la su-
ficiente cantidad de isomerasa de glucosa fijada en
una columna para obtener 1000-4000 UIG en la misma.
Una solución que es 3M en glucosa a pH de 7, 0,001M
en CoCl_2 y 0,005M en MgSO_3 se pasa a través de la co-
30 lumna a un gasto de 20 hasta cerca de 80 ml/hr. La co-



402344

1 lumna se mantiene a la temperatura de 60°C. La frac-
ción de glucosa transformada en fructosa en el efluen-
te se determina después de 20 horas para asegurar que
5 el lecho de isomerasa de glucosa fijada se encuentra
en condiciones de equilibrio. El índice de actividad
de la isomerasa de glucosa fijada se calcula haciendo
uso de la siguiente fórmula:

Indice de actividad = $(R/E) \log (0,504/(0,504-I))$, en
donde I es la fracción de glucosa convertida en fruc-
tosa, R es el gasto de flujo (ml/hr) y E es el núme-
ro de UIG iniciales en la columna.

10 El índice de actividad se determina periódicamente;
el tiempo requerido para que el índice de actividad
alcance la mitad del valor inicial (valor después de
15 20 horas) es el valor de estabilidad en horas.

UNIDADES DE COLOR

El color se determina por métodos espectrométricos mi-
diendo la absorbancia a 450 m μ y 600 m μ de un licor
diluído en forma adecuada y con una celda de 1 cm to-
mando como referencia el agua. El espectrometro con-
sistió de un aparato Beckman DK-2A manufacturado por
20 la Beckman Instrument Company. El color se calcula
utilizando la siguiente fórmula:

25 Unidades de color =
$$\frac{109 (A_{450} - A_{600})}{C}$$

A₄₅₀ = absorbancia a 450 m μ

A₆₀₀ = absorbancia a 600 m μ

30 C = concentración en gramos de sustancia seca por 100
ml de licor.



402344

1

CONTENIDO DE FRUCTOSA EN EL LICOR ISOMERIZADO

5

10

15

20

25

30

El contenido de fructosa en el licor isomerizado se determinó midiendo el cambio de la rotación específica que se presenta durante la isomerización. La rotación específica se determinó utilizando un polarímetro automático NPL Modelo 969 de la Bendix Corporation. Las rotaciones se determinaron a la concentración de 2,5 g/100 ml en una celda de vidrio controlada a 25°C. La trayectoria de la celda fué de 50 mm. Las rotaciones específicas se determinaron al principio de las reacciones de isomerización una vez que todos los ingredientes de la solución conteniendo la glucosa se había combinado. Para determinar el cambio en el contenido de fructosa, se midió la rotación específica del licor isomerizado. Todas las muestras se ajustaron al pH de 4,0 mediante HCl diluído con objeto de interrumpir la acción de la enzima antes de la dilución para la determinación de las rotaciones. El cambio en el contenido de fructosa se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de F} = \frac{100 (A_i - A_o)}{-138,9}$$

A_i = rotación específica del licor isomerizado.

A_o = rotación específica de la solución conteniendo la glucosa antes de la isomerización.

En la fórmula anterior, el factor -138,9 es el cambio de la rotación específica que se presenta cuando la glucosa se transforma completamente en fructosa.

UNIDADES DE ISOMERASA DE GLUCOSA INTERNACIONALES (UIGI)

402344-3 MAY



1 Representan la cantidad de enzima que convierte una
micromol de glucosa en fructosa por unidad de minuto
en una solución que contiene 2 moles de glucosa por
litro, 0,02 moles de $MgSO_4$ por litro, y 0,001 mol de
5 $CoCl_2$ por litro a pH de 6,84-6,85 (maleato de sodio
0,2M) y a la temperatura de 60°C.

COEFICIENTE DE CAPACIDAD DE EXTRACCION

10 El material celular conteniendo la isomerasa fijada
o estabilizada se mantiene en una suspensión acuosa
conteniendo 0,001 mol de cloruro de cobalto por li-
tro a la temperatura de 58°C y al pH de 6,5 (regula-
dor de maleato de sodio 0,05M). El material celular
se conserva en estas condiciones durante 20 horas.
Una porción de la suspensión se somete a ondas sónicas
15 a 20 kilociclos mediante el uso de un Sonificador
Branson S75. El material resultante se centrifuga y
el producto resultante se analiza en cuanto a la ac-
tividad de isomerasa. Otra porción de la suspensión
(sin el tratamiento de ondas sónicas) se centrifuga
20 y se determina la actividad de isomerasa del centri-
fugado. La actividad de la isomerasa extraída en el
último centrifugado dividida por la actividad de la
isomerasa en el centrifugado del tratamiento con on-
das sónicas multiplicado por 100 es el coeficiente de
25 capacidad de extracción del material celular tratado.

El procedimiento de la presente invención propor-
ciona ciertas ventajas. Por ejemplo, permite que el procedi-
miento pueda llevarse a cabo de manera fácil y económica a
escala comercial. Por otra parte, es bastante eficiente en
30 cuanto a la utilización de la isomerasa de glucosa y la pro

402344



1
5
10
15
20
25
30

ducción del jarabe de glucosa-fructosa con un color, cenizas y paicosa mínimos. Asimismo, la reacción de isomerización puede realizarse continuamente, lo cual evidentemente es una ventaja notable en cualquier operación de manufactura.

Las características de la solución conteniendo la glucosa son relativamente importantes para determinar las condiciones exactas bajo las cuales se debe realizar la reacción de isomerización. Existen bastantes métodos conocidos en la tecnología para la producción de las soluciones conteniendo la glucosa. Por ejemplo, los métodos que normalmente se aplican comercialmente incluyen la sacarificación del almidón de maiz para formar la glucosa. Estos métodos pueden agruparse en tres categorías. La primera de éstas consiste en un procedimiento ácido en que se hace uso de una solución ácida diluida para la hidrólisis del almidón y formar la glucosa. La segunda categoría consiste en un procedimiento ácido-enzima en que el almidón se licúa por medio de un tratamiento ácido moderado y luego se utiliza una enzima para transformar el almidón licuado en glucosa. La tercera categoría es un procedimiento enzima-enzima en que se aplican dos tratamientos con enzimas, el primero de ellos para licuar el almidón y el segundo para la transformación del almidón licuado en glucosa. En el procedimiento de la presente invención, se prefiere utilizar una solución conteniendo la glucosa producida mediante cualquiera de los dos últimos procedimientos indicados antes, ya que por lo general tales soluciones contienen mayores cantidades de glucosa sobre la base de sustancia en estado seco, menores cantidades de ácidos que prácticamente deben neutralizarse,

402344



1 menor color y menores cantidades de oligosacáridos. La solución conteniendo la glucosa puede refinarse, en caso requerido, mediante los procedimientos convencionales antes de someterla al procedimiento de la presente invención.

5 La viscosidad de la solución conteniendo la glucosa debe encontrarse en el intervalo de aproximadamente 0,5 hasta cerca de 100 centipoises y de preferencia en la gama de aproximadamente 2 hasta cerca de 20 centipoises. Cuando la viscosidad de la solución es demasiado alta, la presión requerida para hacer pasar la solución a través del lecho resulta desproporcionadamente alta. La reducción en la presión origina una disminución en las velocidades de flujo, de tal modo que el tiempo en que la solución se encuentra en contacto con la isomerasa fijada puede ser demasiado prolongado para lograr el uso efectivo de la enzima. 10 Asimismo, debido al periodo de tiempo en que la solución se mantiene bajo las condiciones de isomerización, es decir, temperatura, pH, etc., puede ser excesivo, existe la posibilidad de que se genere una proporción indeseable de color y de psicosa. 15

20 La concentración de glucosa en la solución correspondiente debe encontrarse en el intervalo de aproximadamente 5 hasta cerca de 80% en peso y de preferencia en la gama de aproximadamente 40 hasta cerca de 60%.

25 El pH de la solución conteniendo la glucosa debe encontrarse en el intervalo de aproximadamente 6 hasta cerca de 9, de preferencia desde aproximadamente 6,5 hasta cerca de 8 y más preferentemente desde aproximadamente 7 hasta cerca de 8. Es importante mantener el pH de la solución conteniendo la glucosa dentro de este intervalo durante la reac 30

402344

3 MAY



1 ción de isomerización, ya que cuando la solución se encuen
tra fuera de este intervalo se presenta la desactivación
rápida de la isomerasa y/o la producción de grandes canti-
dades de subproductos indeseables como son los cuerpos co-
5 loridos y la psicosa. En la solución conteniendo la gluco-
sa pueden existir diversos activadores iónicos y/o estabi-
lizadores de la isomerasa, tal como las sales solubles de
cobalto, magnesio, etc.

10 Las características del lecho que contiene las
células de los micro-organismos que han sido tratados para
inhibir la extracción de la isomerasa de las células son
bastante importantes en cuanto a la calidad de la solución
de fructosa-glucosa producida y la utilización comercial
del procedimiento de la invención. El lecho debe contener
15 al menos 3 UIGI de actividad de isomerasa de glucosa por
centímetro cúbico y de preferencia debe contener al menos
20 UIGI por centímetro cúbico. Cuando el lecho contiene me-
nos de 3 UIGI de actividad de isomerasa de glucosa por centí-
metro cúbico, se requiere de un volumen de lecho mayor para
20 la isomerización de cantidades equivalentes de glucosa. Es-
to puede originar varios problemas concurrentes, tal como
mayores gradientes de presión a través del lecho, mayor
tiempo de contacto entre la solución conteniendo la gluco-
sa y la isomerasa para producir el grado requerido de conver-
25 sión de la glucosa a la fructosa y mayores gastos de capi-
tal debido al aumento en el tamaño del equipo necesario pa-
ra contener el lecho de células. Asimismo, a medida que se
aumenta la profundidad del lecho existe una mayor tendencia
en cuanto a la compactación del mismo debido a las mayores
30 presiones requeridas para hacer pasar la solución contenen

23 MAI



402344

1 do la glucosa a través del mismo. Por ejemplo, en un lecho
relativamente poco profundo, esté último solo se puede com-
2 pactar en un pequeño grado mientras que para el caso de un
lecho de mayor profundidad la compactación es mucho mayor.
5 Cuando esto ocurre, el gradiente de presión a través del
lecho aumenta hasta tal grado que la presión necesaria pa-
ra hacer pasar la solución de glucosa a través del lecho
6 pudiera ser extremadamente grande, lo cual a su vez ori-
ginaría que el equipo de construcción convencional no pu-
7 diera usarse para contener el lecho.
10

El valor de estabilidad de la isomerasa de glu-
cosa debe ser al menos de 50 horas, de preferencia al menos
cercano a 300 horas y mas preferentemente al menos de 400
horas.

15 La relación entre la profundidad y el ancho (o
diámetro) del lecho de micro-organismos que contienen la
isomerasa de glucosa unida a las células debe ser al menos
de 2, de preferencia en el intervalo de aproximadamente
0,01 hasta cerca de 0,1 y mas preferentemente en el interva-
20 lo de aproximadamente 0,02 hasta cerca de 0,05. Se conside-
ra que la profundidad del lecho de células que contienen la
isomerasa de glucosa se encuentre, por ejemplo, dentro del
intervalo de una fracción de centímetro hasta cerca de 12,7
cm. Los lechos de células con estas dimensiones proporcio-
25 nan la ventaja de que el gradiente de presión a través del
lecho es pequeño y la compactación del mismo es mínima. Sin
embargo, ya que la profundidad del lecho es relativamente
pequeña, existe una mayor tendencia hacia la formación de
canalizaciones. Estas últimas resultan del uso ineficiente
30 de la isomerasa de glucosa. Cuando se colocan en serie al



1 menos dos lechos y de preferencia al menos 6 lechos de la
isomerasa de glucosa fijada o estabilizada, además de dis-
poner de los medios para mezclar el efluente procedente de
5 un lecho posterior antes de que pase hacia el siguiente le-
cho, cualquier canalización que pudiera presentarse no
tendrá ningún efecto notable en la eficiencia en cuanto al
uso de la isomerasa de glucosa fijada o estabilizada.

10 La isomerasa intracelular puede fijarse o esta-
bilizarse dentro o sobre las células de los micro-organis-
mos por medio de una diversidad de tratamientos. Por ejem-
plo, las células pueden someterse a un tratamiento térmico
mientras se encuentran suspendidas en el caldo total del
15 fermentador original o también pueden tratarse térmicamente
después de haber sido separadas del caldo perteneciente al
fermentador. También se consideran otros métodos para el
tratamiento de las células con el propósito de fijar o esta-
20 bilizar la isomerasa dentro de las células. No se conoce el
mecanismo preciso en que los tratamientos fijan o estabili-
zan la isomerasa, pero se piensa que las enzimas de las cé-
lulas causantes de la autólisis de las mismas, lo cual re-
sulta en la fuga o extracción de la isomerasa, se desactiva
debido a estos tratamientos.

25 Las condiciones del tratamiento se basan en dos
criterios. El primero consiste en que las condiciones del
tratamiento no deben ser tan severas que se presente la des-
trucción o una desactivación demasiado intensa en la canti-
dad de isomerasa de glucosa. El segundo se refiere a que el
coeficiente de capacidad de extracción de las células trata-
das debe ser relativamente bajo. En términos generales, la
30 mayor parte de los tratamientos que fijan o estabilizan la



402344

1 isomerasa resultan en una cierta desactivación de la isome-
2 rasa. Con relación al primer criterio, el tratamiento debe
3 realizarse de tal manera que no más del 50% aproximadamente
4 de la isomerasa se desactive en comparación con las células
5 sin tratar, de preferencia no mas del 40% aproximadamente
6 y mas preferentemente no mas del 15% aproximadamente. El
7 coeficiente de capacidad de extracción de las células trata-
8 das deberá ser menor de aproximadamente 50%, de preferencia
9 menor de aproximadamente 20 y mas preferentemente menor de
10 aproximadamente 10%.

11 Los preparados de isomerasa de glucosa pueden
12 dividirse en dos categorías generales, dependiendo de su
13 susceptibilidad al calor. Como ejemplos de los preparados
14 de isomerasa susceptibles al calor son de mencionarse los
15 derivados de la Pseudomonas hydrophila y de otros micro-or-
16 ganismos. Con objeto de que estos preparados puedan trans-
17 formar fácilmente una cantidad considerable de glucosa en
18 fructosa, generalmente se deben encontrar presentes durante
19 la reacción de isomerizaciones ya sea iones de arsenato o
20 de fluoruro. Los preparados de isomerasa con estabilidad
21 térmica no requieren de tales iones en cuanto a su presen-
22 cia durante la reacción de isomerización para la conversión
23 de cantidades considerables de glucosa en fructosa. Como
24 ejemplos de los micro-organismos que producen preparados
25 de isomerasa de glucosa con estabilidad térmica son de men-
26 cionarse los micro-organismos que pertenecen al género
27 Streptomyces. En el procedimiento de la presente invención
28 se prefiere el uso de preparados de isomerasa con estabili-
29 dad térmica. Cuando se hace uso de estos últimos, es posible
30 la aplicación de temperaturas altas para inhibir o prevenir

402344

3



1 la contaminación microbiana del lecho. Otro de los benefi-
cios derivados del uso de los preparados de isomerasa con
estabilidad térmica consiste en la posibilidad de aplicar
un tratamiento térmico adecuado para fijar la isomerasa.

5 El tratamiento térmico puede consistir en el ca-
lentamiento de las células que contienen la isomerasa con
estabilidad térmica hasta cierta temperatura, manteniendo
las células a esta temperatura durante cierto periodo de
10 tiempo. La temperatura y el tiempo de tratamiento son inter-
dependientes. Para el caso de las temperaturas altas sola-
mente se requiere de periodos de tiempo breves, mientras
que para las temperaturas inferiores son necesarios tiempos
de mayor duración. El tratamiento térmico debe realizarse
15 bajo tales condiciones en que no mas del 50% aproximadamen-
te de la isomerasa se destruya por el tratamiento, de prefe-
rencia no mas del 40% aproximadamente y mas preferentemente
no mas del 15% aproximadamente. Generalmente, las células
que contienen la isomerasa con estabilidad térmica se ca-
20 lientan hasta una temperatura dentro del intervalo de apro-
ximadamente 60º hasta cerca de 90ºC, durante un periodo de
tiempo que varía desde cerca de 60 minutos hasta aproximada
mente 1 minuto y no se presenta mas del 40% aproximadamente
de destrucción de la isomerasa. El pH del medio en que se
tratan las células se encuentra preferentemente en el in-
25 tervalo de aproximadamente 6 hasta cerca de 9. Los resulta-
dos óptimos se han logrado en el intervalo de temperaturas
de aproximadamente 70º hasta cerca de 80ºC, durante un pe-
riodo de tiempo desde aproximadamente 10 hasta cerca de 20
30 minutos y a un pH dentro de la gama de aproximadamente 7
hasta cerca de 8.

402344



1 Para realizar el procedimiento de la presente
invencción se puede hacer uso de un aparato conocido en la
tecnología y el cual consiste de un filtro de hojas. El
filtro de hojas a presión incluye un sistema de elementos
5 de filtración aplanados (hojas) soportados verticalmente
u horizontalmente en un tanque cilindrico. Las hojas pue-
den ser circulares o rectangulares y disponer de superficies
de filtración en ambos lados. El eje largo del tanque cilin-
drico puede ser horizontal o vertical. La hoja del filtro
10 puede consistir de una placa perforada o ranura pesada so-
bre la cual se adapta un medio filtrante, tal como una te-
la tejida o una tela de alambre fino. El material celular
conteniendo la isomerasa fijada puede transformarse en un
lodo con la solución conteniendo la glucosa, procediendo a
15 bombear el lodo a través del filtro de hojas de tal forma
que cada una de las hojas quede cubierta uniformemente con
las células. En el caso de un filtro de hojas a presión de
tipo vertical, la presión aplicada a la solución mantendrá
las células unidas a las hojas. A continuación se puede bom-
20 bear una solución conteniendo la glucosa a través del fil-
tro de hojas a presión y, al mismo tiempo que pasa a través
de cada lecho de material celular conteniendo la isomerasa
fijada, se efectúa la isomerización. La cantidad de fructo-
sa formada dependerá del periodo de tiempo que la solución
25 de glucosa se encuentre en contacto con la enzima fijada.

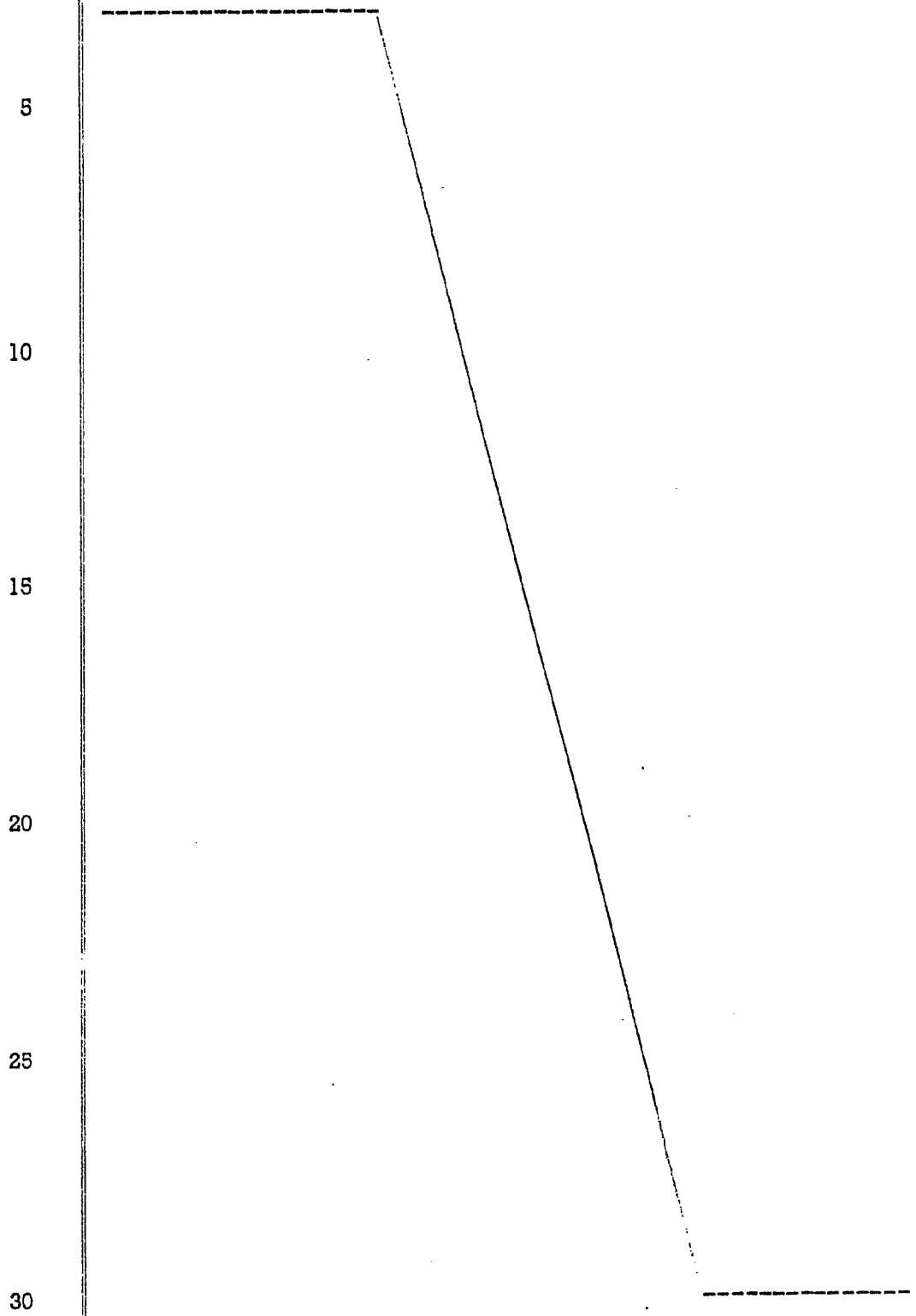
 La composición exacta de la solución conteniendo
la glucosa isomerizada tendrá variaciones, dependiendo esto
de las condiciones precisas en que se realice el procedi-
miento de la presente invencción. En la Tabla 1 que sigue se
30 muestran las características esenciales de las soluciones

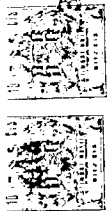
23 MAY 1964



402344

1 conteniendo glucosa isomerizadas obtenidas mediante el pro-
cedimiento de la invención.





18

402344

402344

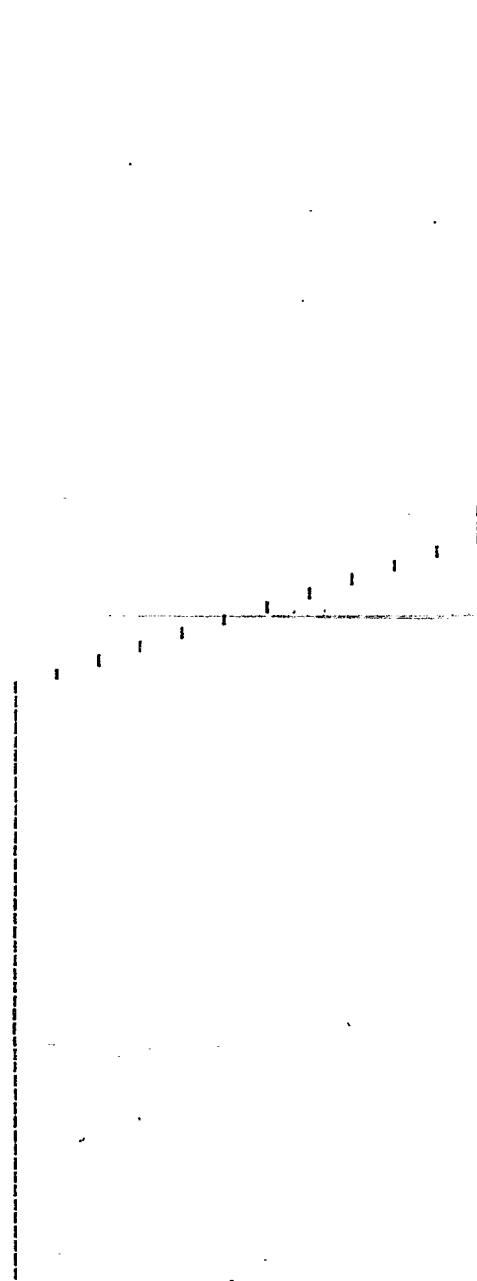
CARACTERÍSTICAS DE SOLUCIONES CONTENIENDO GLUCOSA ISOMERIZADAS

% EN BASE SECA

Intervalos	Glucosa %	Fructosa %	Polisacáridos %	Pisicosa Cenizas %	Unidades de color
Típico	30-60	10-54	0-50	0-1,0 0,1-0,5	0-2
Preferido	30-60	10-54	0-30	0-0,5 0,01-0,2	0-0,05
De mayor preferencia	30-60	10-54	0-30	0-0,1 0,05-0,1	0-0,03

La cantidad de sacáridos depende principalmente de las características del producto requeridas.

Formadas principalmente de sales metálicas que se encuentran presentes durante la isomerización para estabilizar y/o activar la isomerasa de glucosa.



402344



MAY - 18 -

CARACTERISTICAS DE SOLUCIONES CONTENIENDO GLUC

% EN BASE SECA

5

Intervalos	Glucosa *	Fructosa *	Polisacáridos
------------	-----------	------------	---------------

Típico	30-60	10-54	0-50
--------	-------	-------	------

Preferido	30-60	10-54	0-30
-----------	-------	-------	------

10

De mayor			
----------	--	--	--

preferencia	30-60	10-54	0-30
-------------	-------	-------	------

* La cantidad de sacáridos depende principalmente de la ridas...

15

** Formadas principalmente de sales metálicas que se enc zación para estabilizar y/o activar la isomerasa de g

20

25

30



MAY - 18 -

402346

CARACTERISTICAS DE SOLUCIONES CONTENIENDO GLUCOSA ISOMERIZADAS

% EN BASE SECA

Glucosa *	Fructosa *	Polisacáridos *	Pisicosa Cenizas **	Unidades de color
30-60	10-54	0-50	0-1,0 0,1-0,5	0-2
30-60	10-54	0-30	0-0,5 0,01-0,2	0-0,05
30-60	10-54	0-30	0-0,1 0,05-0,1	0-0,03

de sacáridos depende principalmente de las características del producto requere-
principalmente de sales metálicas que se encuentran presentes durante la isomeri-
estabilizar y/o activar la isomerasa de glucosa.

23 MAY 1944



402344

1 Con objeto de describir con mayor claridad la
naturaleza de la presente invención, a continuación se pre-
senta un ejemplo específico. Sin embargo, es de entenderse
que este ejemplo solamente se proporciona como ilustrativo
5 y que no se pretende delinear el campo de la invención o
limitar a la misma en lo referente a las reivindicaciones.

EJEMPLO

10 Este ejemplo ilustra el uso de la isomerasa de
glucosa fijada o estabilizada para la conversión continua
de la glucosa en fructosa.

15 El micro-organismo Streptomyces ATCC 21175 se de-
sarrolló bajo condiciones aeróbicas sumergidas. El pH del
caldo conteniendo el material celular se ajustó a 7,5, pro-
cediendo al calentamiento del mismo durante media hora has-
ta alcanzar la temperatura de 75°C, manteniéndolo a esta
temperatura durante 5 minutos para fijar la isomerasa en las
células. Se incorporó 3% en peso de un filtro ayuda en el
caldo continuando con la filtración en un filtro al vacío
de tipo tambor rotatorio que previamente se recubrió con
20 tierra de diatomáceas. El material celular se lavó en el
filtro. La torta del filtro resultante se desecó en un se-
cador de aire forzado a la temperatura de aire de 49°C du-
rante un periodo de tiempo cercano a 3,5 horas para dar lu-
gar a un preparado de isomerasa fijada consistente del ma-
25 terial celular conteniendo la isomerasa fijada mezclada con
el filtro ayuda. El coeficiente de capacidad de extracción
del preparado de isomerasa fijada en estado seco fué de 15%
y el valor de estabilidad resultó ser de 645 horas.

30 Una proporción de 116 kg del preparado de isome-
rasa fijada seco se mezclaron durante cerca de 2 minutos y

402344



3 MAY. 1977

1 luego se transformaron en un lodo con una solución "contienen
do glucosa consistente de un hidrolizado de almidón de maíz
refinado a pH de 7 y la cual contenía 60 g de glucosa por
100 ml, 4,5 g de maltosa, isomaltosa y oligosacáridos por
5 100 ml, 0,001 mol de CoCl_2 por litro, 0,01 mol de MgSO_4
por litro y 0,006 mol de NaHSO_3 por litro. La temperatura
de la solución de glucosa fué de 65°C. El lodo se bombeó a
través de un filtro de hojas a presión (manufacturado por
Industrial Filter Pump Mfg. Co., Cicero, Ill.) que disponía
10 de 6 hojas de filtración y en que cada una de las hojas se
recubrió con una capa de 2,54 a 3,81 cm del preparado de
isomerasa. La actividad total de la isomerasa en las hojas
fué de $1,26 \times 10^7$ UIGI. El área superficial total de las
hojas del filtro fué de $6,88 \text{ m}^2$. La solución de glucosa se
15 suministró continuamente al filtro a un gasto tal que el
45% de la glucosa se transformó en fructosa. La velocidad
de flujo se redujo gradualmente a medida que la actividad
de la isomerasa fijada en las hojas disminuyó, de tal forma
que la conversión de glucosa en fructosa se conservó
20 constante a un valor de 45%. Al finalizar un periodo de
tiempo de aproximadamente 40 horas, la velocidad de flujo
a través de las hojas era de 3,78 litros por minuto. Después
de 200 horas, la velocidad de flujo era de 1,89 litros por
minuto y el gradiente de presión a través de las hojas re-
25 sultó ser de $7,03 \times 10^{-2} \text{ kg/cm}^2$. El color de la solución
conteniendo la glucosa a la entrada del lecho fué de 0,01
unidades y el color de la solución a la salida del lecho
fué de 0,02 unidades.

30 En resumen la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

402344



REIVINDICACIONES

1

1. Un procedimiento para la conversión enzimática de la glucosa en fructosa, en donde el procedimiento está caracterizado por la formación de una solución conteniendo la glucosa que tiene una viscosidad de 0,5 a 100 centipoises, pH de 6 á 9 y conteniendo de 5 á 80% en peso de glucosa; calentamiento de la solución hasta una temperatura de 20º á 80ºC y paso de la solución a través de un lecho formado de células de micro-organismos que contienen la isomerasa de glucosa intracelular, las cuales se tratan previamente para inhibir la extracción de la isomerasa de las células, cuya actividad de isomerasa de glucosa es al menos de aproximadamente 3 Unidades de Isomerasa de Glucosa Internacionales por centímetro cúbico de lecho, teniendo un valor de estabilidad al menos de aproximadamente 50 horas y una relación de profundidad a ancho al menos de aproximadamente 2, a una velocidad de flujo en que se logre hasta el 54% de conversión de la glucosa en fructosa, aumentando el color de la solución convertida en menos de 2 unidades de color y en donde no existe una producción considerable de psicosa.

5

10

15

20

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado en que la viscosidad de la solución conteniendo la glucosa es de 2 á 20 centipoises y el pH es de 6,5 á 8.

25

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado en que la solución conteniendo la glucosa consiste de 40 á 60% en peso de glucosa y en que el pH de la solución es de 7 á 8.

30

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 á 3, caracterizado en que el lecho



402344

1 conteniendo las células de micro-organismos contiene al
menos 20 Unidades de Isomerasa de Glucosa Internacionales
por centímetro cúbico de lecho y en donde el valor de esta
5 bilidad de las células de micro-organismos es al menos de
300 horas.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 4, caracterizado en que el valor de estabilidad de
las células es al menos de 400 horas.

10 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 1 á 5, caracterizado en que el le-
cho tiene una relación de profundidad a ancho de 0,01 á 0,1.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 6, caracterizado en que la relación entre la profun-
didad y el ancho del lecho es de 0,02 á 0,05.

15 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 1 á 7, caracterizado en que la so-
lución conteniendo la glucosa se hace pasar al menos a
través de dos lechos colocados en serie.

20 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 1 á 7, caracterizado en que la so-
lución conteniendo la glucosa se hace pasar al menos a
través de seis lechos colocados en serie.

25 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 1 á 9, caracterizado en que las cé-
lulas se derivan de micro-organismos de embriones de Strep-
tomyces.

30 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 10, caracterizado en que las células se derivan de
Streptomyces ATCC 21175.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera

402344



1 de las reivindicaciones 1 á 11, caracterizado en que la so
lución conteniendo la glucosa se produce mediante el tra-
tamiento del almidón con un ácido para licuar el almidón
y luego sometiendo a tratamiento el almidón licuado con una
5 enzima formadora de glucosa para obtener la solución mencio-
nada.

13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 1 á 11, caracterizado en que la
solución conteniendo la glucosa se produce mediante el tra-
10 tamiento del almidón con una enzima para licuar el almidón
y luego sometiendo a tratamiento el almidón licuado con una
enzima formadora de glucosa para obtener la solución men-
cionada.

14. Se reivindica por último como objeto sobre
15 el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-
ta: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA CONVERSION ENZIMATICA DE LA
GLUCOSA EN FRUCTOSA".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva, que consta de veintitrés
20 páginas mecanografiadas.

Madrid, 3 de mayo de 1972.

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25

30