

411297

411297



PATENTE DE INVENCION

Int. Cl.: C13K

MEMORIA DESCRIPTIVA

sobre:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE FRUCTOSA Y DE JARABES
DE FRUCTOSA Y GLUCOSA"

Solicitante: SNAM PROGETTI S.p.A.,
entidad italiana, establecida en
MILAN (Italia), Corso Venezia, 16.

Prioridad: Solicitud de Patente N° 19884 A/72,
depositada en Italia en
28 de Enero de 1972.

411297



La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa que tengan una composición análoga a la del azúcar invertido.

5 Más particularmente, el procedimiento según la invención hace uso de la enzima glucosa isomerasa purificada y englobada en estructuras filamentosas.

Son conocidos procedimientos para la isomerización de la glucosa y la fructosa. Estos procedimientos son sustancialmente de dos tipos: Isomerización química e isomerización enzimática.

El primer método consiste en tratar con un catalizador alcalino los azúcares que deban isomerizarse; sin embargo, mediante este método se obtienen bajos rendimientos a causa de la formación de productos secundarios debido a la inestabilidad de los azúcares en un medio alcalino.

La isomerización enzimática se efectúa empleando como enzima la glucosa isomerasa cruda o utilizando directamente el cultivo de un microorganismo.

20 En ambos casos se obtiene, sin embargo, una escasa actividad debido al bajo grado de pureza de las enzimas empleadas, lo cual obliga a operar a temperaturas más elevadas con el consiguiente oscurecimiento de las soluciones azucaradas obtenidas. La refinación de las soluciones azucaradas por medio de tierras decolorantes comporta un considerable costo económico y tecnológico. Además, las celdas sólo pueden ser utilizadas un número de veces muy limitado.

411297



Sería posible obtener un aumento de la actividad enzimática mediante un costoso proceso de purificación, pero ello haría imposible llevar a cabo el proceso de isomerización de manera económica, ya que la enzima es utilizada una sola vez y permanece en el producto de reacción, del cual es eliminada después.

Se ha descubierto que es posible efectuar la isomerización enzimática con una actividad elevada mediante un procedimiento económicamente ventajoso, utilizando una enzima en una forma considerablemente activa que permite operar con elevadas conversiones y a bajas temperaturas.

El procedimiento según el presente invento consiste en el empleo de glucosas isomerasas englobadas en estructuras filamentosas. Tal método presenta la ventaja, respecto al empleo de las enzimas, de poder utilizar la misma enzima un número de veces indefinido por cuanto la enzima desarrolla su acción catalizadora permaneciendo firmemente anclada al soporte filamentosos que la engloba y el contacto con el sustrato se realiza a través de una membrana muy fina que la separa del ambiente circundante.

Tal procedimiento permite utilizar una enzima de elevado grado de pureza dado que una vez englobada en la estructura filamentosas, la enzima puede ser empleada un elevado número de veces y el costo de purificación resulta así notablemente disminuido.

Se tiene adicionalmente la ventaja de eliminar completamente la contaminación del producto de reacción obtenido ya

411297



que no se produce dispersión de la enzima que permanece en el interior de los alvéolos de la estructura filamentosa.

La estructura filamentosa empleada y el método de englobamiento de la enzima son aquellos descritos en la patente italiana Nº 836.462, según la cual las fibras englobantes de enzima pueden ser preparadas a partir de soluciones de polímeros capaces de proporcionar fibras, en las cuales se dispersan preparados enzimáticos en forma de minúsculas gotitas del orden de magnitud de las emulsiones. La emulsión así obtenida puede ser hilada en húmedo o en seco para dar una fibra que presenta en su interior pequeñísimas cavidades en las cuales se disponen las enzimas que quedan separadas del ambiente por una membrana muy fina, la cual impide la salida hacia el exterior de las enzimas y su dispersión en la masa de reacción y sin embargo permite que la enzima pueda desarrollar su acción catalítica.

Los polímeros útilmente empleables en la preparación de fibras enzimáticas deben poder existir en solución a una temperatura compatible con la estabilidad de la enzima en un disolvente que debe ser sustancialmente inmisible con el disolvente en el cual se ha diluido o dispersado la enzima.

Su disolvente no debe ser nocivo para la estabilidad de la enzima y no debe presentar una acción desactivante con respecto a la enzima. Además, en el caso de hilado por vía húmeda, el coagulante debe ser miscible con el disolvente

411297



del polímero y tener las características del disolvente arriba mencionado.

Entre los polímeros que pueden englobar las enzimas pueden citarse:

5 Los polímeros celulósicos esterificados, nitratos, poliolefinas, los polímeros y copolímeros obtenidos del acrilonitrilo, acrilatos, metacrilatos, ésteres vinílicos, cloruro de vinilo, cloruro de vinilideno, estireno y también las poliamidas, el polivinilbutiral y similares.

10 Particularmente ventajoso para realizar el procedimiento de la presente invención ha resultado el empleo de polímeros celulósicos esterificados. Además de mantener las ventajas del empleo de la isomerización enzimática convencional, la presente invención introduce notables mejoras.

15 La enzima englobada presenta una buena duración de actividad y es entonces posible reutilizarla un número indefinido de veces con positivo reflejo sobre la economía.

Dada la duración de actividad, es posible englobar un preparado enzimático de extrema pureza sin que el costo
20 de purificación incida de manera notable sobre el proceso. Ello hace posible la obtención de fibras muy activas que permitan trabajar en tiempos breves a temperaturas y pH tales que eviten la descomposición de los azúcares obteniendo de tal modo soluciones finales prácticamente incoloras,
25 con un notable ahorro de carbón decolorante. Además, la proteína enzimática no difunde en el medio de reacción y no contamina el producto. Otra ventaja muy importante consiste en



411297

la posibilidad de operar en forma continua con evidente simplificación de la instalación y con posibilidades de automatizar el procedimiento. Regulando oportunamente la velocidad de flujo, la cantidad de fibra y su concentración enzimática, es posible obtener la isomerización al nivel deseado del efluente. El procedimiento aquí descrito puede ser realizado en discontinuo, en el que el contacto enzima-sustrato tiene lugar durante el tiempo necesario para obtener el grado de isomerización deseado. El jarabe isomerizado puede ser entonces separado y sustituido por un nuevo jarabe utilizando la misma fibra enzimática.

La enzima a englobar puede ser extraída de una fuente microbica adecuada. Puede ser englobada como extracto no refinado o crudo por rotura mecánica o por lisis (desintegración o destrucción) de las células o bien puede ser purificada con métodos normales de purificación de las proteínas. La temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso de isomerización varía entre 30° y 70°C, preferiblemente 40-45°C; el pH entre 5,0 y 9,0, operándose preferiblemente alrededor de 7,0. La solución de isomerización puede ser una solución tamponada de glucosa en agua preferiblemente al 50 % (en peso) conteniendo pequeñas dosis de iones Mg^{++} y Co^{++} , o bien puede estar constituida por una solución de glucosa obtenida por la acción de la glucoamilasa sobre almidón.

Otras modalidades operativas resultarán de los ejemplos que a continuación se describen al solo fin de mejor ilustrar

411297



trar la presente invención.

EJEMPLO 1

Se tiene a disposición para el englobamiento una solución, en agua-glicerina (75:25), de glucosa isomerasa
5 obtenida de células de estreptomicina por lisis y sucesiva precipitación con acetona, teniendo las siguientes características: actividad 364 unidades / ml (1 unidad es la cantidad de enzima que produce en 1 hora a 45°C, 1 mg de fructosa de solución 0,5 M de glucosa a pH 7,0), proteínas
10 22 mg/ml.

Se disuelven bajo agitación, en un reactor, 20 g de triacetato de celulosa (Fluka) en 266 g de cloruro de metileno. Se adicionan 40 g de solución enzimática a la solución del polímero y se favorece la emulsión de las dos fases
15 con enérgica agitación a 0°C durante 30 minutos. La emulsión es vertida en un recipiente mantenido a -6°C e hilada bajo presión de nitrógeno.

El hilo se coagula en tolueno a temperatura ambiente recogiénolo en aspás.

20 Se seca bajo vacío a 0°C durante el tiempo necesario para eliminar los disolventes orgánicos.

2,8 g de fibra así obtenida, correspondientes a aproximadamente 1,4 g de polímero seco, son lavados con tampón fosfato 0,05 M, a un pH 7,0 para separar la enzima absorbida
25 y sucesivamente colocados en 25 ml de una solución acuosa de la siguiente composición: glucosa 60 % (en volumen); CoCl_2 , 10^{-4} M; MgCl_2 , 5×10^{-3} M. Se agita a 45°C y se mantiene el

pH a 7,0 con pH -stato, agregando NaOH. Después de 24 horas, por vía polarimétrica, se determina un porcentaje de isomerización igual a 45,5. Descargada la mezcla isomerizada, se pone en contacto con la misma fibra una solución fresca
5 de glucosa para un nuevo ciclo de isomerización. Después de 6 días de sucesivas operaciones, el porcentaje de isomerización después de 24 horas es de 41 %, después de 12 días 28,7 %, después de 18 días 26,5 %. La separación es efectuada durante 45 días.

10 Parte de los jarabes isomerizados fue utilizada para la separación de la fructosa previa deionización con resinas a intercambio iónico y sucesiva precipitación de la fructosa con sales de calcio a pH alcalino.

EJEMPLO 2

15 25 g de fibra englobando glucosa isomerasa, preparada según lo descrito en el ejemplo 1, son dispuestos en hilos paralelos en una columna de vidrio (1,3 x 40 cm); mantenida termoestáticamente a 45⁰C. Mediante una bomba peristáltica se envía de abajo hacia arriba, a un flujo de 7 ml/h, una
20 solución constituida por tampón fosfato de pH 7,0, 0,05 M, glucosa 60 %, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 10^{-4} M, MgCl_2 5×10^{-3} M. En el efluente se tiene un porcentaje de isomerización de 40 %.

EJEMPLO 3

25 10 g de amiloglucosidasa, polvo Diazyme (Miles) son suspendidos en 50 ml de agua deionizada y agitados durante 20 minutos para favorecer la solubilización de la proteína activa. Se filtra para eliminar el soporte insoluble y se

411297



lava la torta de filtración. Reunidos el filtrado y el lavado, se concentran bajo vacío a 25°C hasta un volumen final de 20 ml. A la solución así obtenida se adicionan 20 ml de solución de glucosa isomerasa (364 unidades/ml; 5 proteínas 22 mg/ml).

Las soluciones mixtas de glucosa isomerasa y amiloglucosidasa son englobadas, según el método descrito en el ejemplo 1, en 40 g de triacetato de celulosa.

20 g de la fibra resultante son dispuestos en hilos 10 paralelos en una columna de vidrio (2,5 x 40 cm) mantenida termostáticamente a 45°C. Mediante una bomba peristáltica se hacen circular en circuito cerrado por el interior de la columna 500 ml de una solución al 35 % en volumen de almidón de maíz licuado previamente con α -amilasa y adicionada con 15 sales de cobalto y magnesio ($Mg^{++} 5 \times 10^{-3}M$, $Co^{++} 10^{-4}M$).

La solución pasa por un pulmón en el cual se controla y mantiene el pH a 6,5 mientras recicla sobre el catalizador enzimático, obteniéndose contemporáneamente la hidrólisis de las dextrinas a glucosa y la isomerización de la glucosa a 20 fructosa. La recirculación de la solución se efectúa hasta obtener una estabilización del poder óptico rotatorio (~ 72 h).

El análisis de la solución obtenida hasta este punto revela una concentración en glucosa de 191 mg/ml y en fructosa de 129 mg/ml, siendo formado el resto por 25 disacáridos y oligosacáridos. La misma operación fue repetida con la misma muestra de fibra durante 15 días sin ninguna disminución apreciable de actividad.



411297

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio
5 fundamental puede quedar sometido a variaciones de detalle. También se hace constar que esta invención corresponde a la Solicitud de Patente N° 19884 A/72, depositada en Italia en 28 de Enero de 1972, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial
10 y por lo que se solicita Patente de Invención, por veinte años, lo que queda resumido en las siguientes reivindicaciones:

1ª.- Procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa, mediante isomerización enzimática de α -glucosa, caracterizado porque como enzima
15 catalizadora de la isomerización se emplea una glucosa isomerasa englobada en una estructura filamentosa.

2ª.- Procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la reacción se realiza a temperaturas
20 comprendidas entre 30° y 70°C, preferiblemente entre 40 y 45°C.

3ª.- Procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el pH del medio de reacción se
25 mantiene entre 5 y 9 y preferiblemente alrededor de 7.

4ª.- Procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa según las reivindicaciones pre-

411297

27



cedentes, caracterizado porque la solución de glucosa destinada a ser isomerizada contiene pequeñas cantidades de iones Mg^{++} y Co^{++} .

5 5^a.- Procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la enzima utilizada, englobada en estructuras fibrosas, se constituye por glucosa isomerasa de elevado grado de pureza.

10 6^a.- Procedimiento para la producción de fructosa y de jarabes de fructosa y glucosa según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se tratan poli- α -glucósidos con preparados fibrosos bioenzimáticos conteniendo amiloglucosidasas y glucosa-isomerasas.

15 7^a.- PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE FRUCTOSA Y DE JARABES DE FRUCTOSA Y GLUCOSA, tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria que consta de once hojas mecanografiadas por una sola cara.

BARCELONA, 27 de Enero de 1973.

SNAM PROGETTI S.p.A.
P.P.

J. GOMEZ ACEBO Y MODET

por el Firmador W. Stohell Stoner