

415711



F.e. 21-5-75

Int. Cl.²: C13K

No. 415.711

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. USA.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA CONVERTIR ENZIMATICAMENTE GLUCOSA EN FRUCTOSA.

Prioridad: Patente n.º del.....

TP.



415711

1

El presente invento se refiere a un procedimiento para convertir enzimáticamente en fructosa una porción de la glucosa en una solución que contiene glucosa.

5

Se conocen muchos procedimientos en la técnica para producir soluciones que contienen fructosa, los cuales pueden agruparse en tres amplias categorías. En la primera de éstas, la sucrosa se invierte a glucosa y fructosa utilizando un ácido o una invertasa.

10

En la segunda categoría, la glucosa se convierte en fructosa mediante el uso de catalizadores alcalinos. Se cuenta con numerosos artículos y patentes que describen varios catalizadores alcalinos y su uso, para convertir la glucosa en fructosa. En las patentes estadounidenses números 2.487.121, 2.746.889, 2.354.665, 3.285.776, 3.383.245 y 3.305.395, se describen procedimientos representativos que emplean catalizadores alcalinos. Sin embargo, hay varios inconvenientes claros que se asocian a la isomerización alcalina. Por ejemplo, debido a la falta de selectividad de los estabilizadores alcalinos, se forman varios productos secundarios inconvenientes, por ejemplo, grandes cantidades de masas coloreadas y de materiales ácidos. La operación de refinar los licores isomerizados con un álcali para eliminar los productos secundarios objetables y obtener un producto aceptable requiere procedimientos algo complicados y costosos.

15

20

25

30

La tercera categoría para producir soluciones que contienen fructosa implica la conversión enzimática de la glucosa, en una solución que contiene glucosa, v.gr.: jara-be de maíz, en fructosa. En la técnica se conocen varios microorganismos que producen isomerasa de glucosa. Por ejemplo, en un artículo publicado en Science, Vol. 125, pp.648-9

415711

-9



1 (1957), se describe que una enzima derivada de la Pseudomonas hydrophila isomeriza la glucosa para convertirla en fructosa. Asimismo, la patente británica 1.103.394 y la patente japonesa 7428 (1966) otorgada a Takasaki y colaboradores, -
5 exponen que los microorganismos clasificados dentro del género Streptomyces, v.gr.: Streptomyces flavovirens, Streptomyces achromogenes, Streptomyces echinatus y Streptomyces albus, producen isomerasa de glucosa. En la técnica se describen muchos otros microorganismos productores de isomerasa de glucosa, algunos de los cuales son, por ejemplo: Aerobacter cloacae, Bacillus megaterium, Acetobacter suboxydans, Acetobacter melanogenus, Acetobacter roseus, Acetobacter oxidans, Bacillus fructose y Lacto-bacillus fermenti.

15 Por la economía que implica la producción de isomerasa de glucosa, reviste máxima importancia el hecho de usar la isomerasa en condiciones que produzcan óptimos rendimientos de fructosa, con cantidades mínimas de isomerasa de glucosa. Además, las condiciones de la isomerización deben ser de tal naturaleza que se obtengan cantidades mínimas de productos secundarios inconvenientes.

20 En primer lugar, los microorganismos aludidos producen la isomerasa de glucosa intracelularmente. Así pues, la porción principal de la isomerasa de glucosa se encuentra dentro y/o en las paredes de las células de los microorganismos. -
25 Normalmente, cuando estas células se usan para isomerizar la glucosa en fructosa, la isomerasa se libera durante la isomerización o se extrae de ellas. Cuando la isomerasa se libera o se extrae de las células está esencialmente solubilizada. La operación de recobrar la isomerasa solubilizada, de modo
30 que pueda utilizarse en otra reacción de isomerización, repre

415711



1 senta un procedimiento algo costoso y complicado.

 En un artículo titulado "A Continuous Glucose -
Isomerization Method by an Adsorbed Enzyme Column", de -
Tsumura y colaboradores, publicado en Nippon Shokuhin Kogyo
5 Gakkaishi, 14 (12) 1967, la isomerasa de glucosa, derivada
del Streptomyces phaeochromogenes, está ligada a DEAE-Sephadex.
Esta enzima ligada se pone en una columna a la cual se ha-
ce pasar continuamente una solución de glucosa. A medida -
que la glucosa establece contacto con la enzima ligada, la
10 fructosa se produce en forma continua. Si bien el procedi-
miento que se expone en dicho artículo ofrece, al parecer,
una solución al problema consistente en la reutilización de
la isomerasa de glucosa, se llevó a cabo en una escala tan
pequeña que los parámetros de la elaboración no pueden -
15 aplicarse a la práctica comercial. Por lo tanto, sería di-
fícil, si no es que materialmente imposible, ajustar dicho
procedimiento a escala comercial y obtener una solución que
contenga glucosa y fructosa de calidad aceptable.

 Así pues, se hace necesario un procedimiento con-
20 tínuo para la isomerización enzimática comercial de la glu-
cosa en fructosa.

 De acuerdo con el presente invento, se proporcio-
na un procedimiento para convertir enzimáticamente la glu-
cosa en fructosa, el cual consiste en formar una solución
25 que contiene glucosa, con una viscosidad de 0,5 a 100 cen-
tipoises, un pH comprendido entre 6 y 9 y que contiene del
5 al 80 por ciento de glucosa por peso; manteniendo dicha
solución a una temperatura de 20° a 80° C, mientras se pasa
la solución por una capa de isomerasa de glucosa ligada que
30 tiene una actividad mínima de isomerasa de glucosa de 3 -

415711



1 IGIU por centímetro cúbico de capa y un valor de estabili-
dad mínimo de 50 horas a una velocidad de circulación por
la cual alrededor del 54 por ciento de la glucosa se con-
vierte en fructosa, el color de la solución convertida au-
5 menta en menos de 2 unidades de color y no hay producción
considerable de psicosa.

Varios términos y expresiones que se emplean en
lo anterior y en la siguiente descripción, así como en los
ejemplos, se definen como sigue:

10

VALOR DE ESTABILIDAD

El valor de estabilidad se determina poniendo en
una columna una cantidad de la isomerasa de glucosa ligada
suficiente para obtener de 1000 a 4000 IGIU. Una solución -
que es 3 molar en glucosa a un pH de 6,5, 0,001 molar en -
15 CoCl_2 y 0,005 molar en MgSO_3 , pasa por la columna a razón -
de 10 a 200 ml por hora. La columna se mantiene a una tempe-
ratura de 60°. La fracción de glucosa convertida en fructo-
sa en el efluente se determina después de 4 horas, para ase-
guirse de que la capa de isomerasa de glucosa ligada está -
20 en condiciones de equilibrio. El índice de actividad de la
isomerasa de glucosa ligada se calcula aplicando la fórmula
siguiente: Índice de actividad = $(R/E) \log$ de $(0,504/(0,504 -$
 $I))$, en la cual: I es la fracción de glucosa convertida en
fructosa, R es la proporción de la circulación (ml/hr) y E
25 es el número de IGIU que hay inicialmente en la columna.

25

El índice de actividad se determina periódicamen-
te y el tiempo que transcurre para que el índice de activi-
dad alcance la mitad del valor inicial (valor después de 4
horas) es el valor de estabilidad en horas.

30

415711

- 6 -



UNIDADES DE COLOR

1

El color se determina espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 450 mμ y a 600 mμ, de un licor - apropiadamente diluido en una célula de 1 cm., en comparación de agua como referencia. El espectrofotómetro utilizado fue un Beckman DK-2A, fabricado por Beckman Instrument - Company. El color se calcula aplicando la fórmula siguiente:

5

$$\text{Unidades de Color : } \frac{(109 (A_{450} - A_{600}))}{C}$$

10

A_{450} = Absorbancia a 450 mμ

A_{600} = Absorbancia a 600 mμ

C = Concentración (g/100 ml)

CONTENIDO EN FRUCTOSA DEL LICOR DE ISOMERIZACION

15

El contenido en fructosa del licor isomerizado - se determina midiendo el cambio en la rotación específica que se producen durante la isomerización. Las rotaciones específicas se miden utilizando un Polarímetro Automático, - Modelo 969, de la Bendix Corporation. Las rotaciones se determinan a una concentración de 2,5 g/100 en una celda de vidrio regulada térmicamente a 25º C. El trayecto de la celda es de 50 mm. Las rotaciones específicas se determinan al iniciarse las reacciones de isomerización, después de haberse combinado todos los ingredientes en las soluciones que contienen glucosa. Para determinar el cambio en el contenido de fructosa se determina la rotación específica del licor isomerizado. El cambio en el contenido de fructosa se calcula empleando la fórmula siguiente:

20

25

$$\text{Porcentaje de fructosa : } \frac{100 (A_1 - A_0)}{-138,9}$$

30

A_1 = rotación específica del licor isomerizado.

415711

- 7 -



1 A_0 = rotación específica de la solución que contiene glucosa, antes de la isomerización.

En la fórmula, el factor -138,9 es el cambio que ocurre en la rotación específica cuando la glucosa se convierte completamente en fructosa.

IGIU

IGIU es la abreviatura de International Glucose Isomerase Unite (Unidad Internacional de Isomerasa de Glucosa) y representa la cantidad de enzima que convierte 1 mi cromol de glucosa en fructosa por minuto, en una solución que inicialmente contiene 2 moles de glucosa por litro, - 0,02 moles de $MgSO_4$ por litro y 0,001 mol de $CoCl_2$ por litro, a un pH de 6,84 a 6,85 (maleato sódico 0,2 M) y a una temperatura de 60° C.

15 El procedimiento del presente invento depara varias ventajas distintivas. Por ejemplo, suministra un procedimiento que, de manera fácil y económica, puede llevarse a cabo en una operación comercial. Además, es en extremo eficiente por lo que respecta a la utilización de la isomerasa de glucosa y a la obtención de un jarabe de glucosa y fructosa que contiene un color mínimo, ceniza y psicosa. Además, la reacción de isomerización puede efectuarse de - una manera continua, lo que, por supuesto, constituye una - ventaja clara en cualquier operación de manufactura.

25 Las características de la solución que contiene glucosa son de cierta importancia para determinar las condiciones exactas en las cuales se efectúa la reacción de - isomerización. En la técnica se conocen muchos métodos para obtener soluciones que contienen glucosa. Por ejemplo, los métodos que por lo común se practican a escala comer--

415711

- 8 -

- 9



1 cial, implican, principalmente, la sacarificación del almi
dón de maíz para convertirlo en glucosa. Estos métodos pue
den agruparse en tres categorías. La primera consiste en un
procedimiento ácido, en el cual se utiliza una solución -
5 ácida diluída para hidrolizar el almidón y convertirlo en
glucosa. El segundo es un procedimiento a base de enzima y
ácido, en el cual el almidón es licuado por un tratamiento
ácido moderado, utilizando en seguida una enzima para con-
vertir el almidón licuado en glucosa. El tercero es un proce
10 dimiento a base de enzima-enzima, en el cual se aplican dos
tratamientos con enzimas, el primero para licuar el almidón
y el segundo para convertir el almidón licuado en glucosa.
En el procedimiento del presente invento, se prefiere usar
una solución que contiene glucosa, obtenida mediante cual-
15 quiera de los dos últimos procedimientos, ya que, por lo -
general, dichas soluciones contienen mayores cantidades de
dextrosa, basándose en el peso de la sustancia seca, menores
cantidades de ácidos, menos color y menores cantidades de
oligosacáridos. La solución que contiene glucosa puede re-
20 finarse, si así conviene, por medio de un dispositivo con-
vencional, antes de ser sometida al procedimiento del pre-
sente invento.

La viscosidad de la solución que contiene gluco-
sa debe estar en una escala aproximada de 0,5 a 100 centí-
25 poises y, de preferencia, entre 2 y 20 centipoises. Si la
viscosidad de la solución es demasiado alta, la presión ne-
cesaria para pasar la solución a través de la capa tendrá
que ser inmoderadamente alta. La reducción en la presión -
redunda en una reducción de las velocidades de circulación,
30 de manera que el tiempo en que la solución esté en propor-

415711

- 9 -



1 ción con la isomerasa ligada puede ser demasiado largo para
hacer un uso efectivo de la enzima.

5 Asimismo, como la duración del tiempo en que la solu-
ción se mantiene en condiciones de isomerización, v.gr.: tem-
peratura, pH, etc., puede ser excesiva, existe la probabili-
dad de que se forme una cantidad inconveniente de color y de
psicosa.

10 La concentración de la glucosa en la solución que la
contiene debe ser aproximadamente de 5 a 80 por ciento en -
peso y, de preferencia, de 40 a 60 por ciento en peso.

15 El pH de la solución que contiene glucosa debe estar
comprendido entre 6 y 9 y, de preferencia, entre 6,5 y 8 y,
más preferentemente, entre 7 y 7,5. Es importante mantener
el pH de la solución que contiene glucosa dentro de esta -
escala durante la reacción de isomerización, pues si la -
solución está fuera de dicha escala la isomerasa se inacti-
va rápidamente y/o se producen grandes cantidades de produc-
tos secundarios inconvenientes, como el color y la psico-
sa. En la solución que contiene glucosa puede haber varios
20 activadores de iones metálicos y/o estabilizadores de la -
isomerasa, por ejemplo, sales solubles de cobalto, magnesio,
etc.

25 Las características de la capa de isomerasa de gluco-
sa ligada son en extremo importantes con respecto a la cali-
dad de la solución de fructosa-glucosa que se produzca y -
a la aplicación comercial del presente procedimiento. La -
capa debe contener cuando menos 3 IGIU de actividad de iso-
merasa de glucosa por centímetro cúbico y, de preferencia -
y cuando menos, debe contener 20 IGIU por centímetro cúbico.
30 Si la capa contiene menos de 3 IGIU de actividad de iso-

415711

9 AGO



1 merasa de glucosa por centímetro cúbico será necesario un
mayor volumen de capa para isomerizar cantidades equivalen
tes de dextrosa, lo cual puede plantear varios problemas -
concomitantes, v.gr.: mayores caídas de presión a través -
5 de la capa, tiempos más prolongados de contacto entre la -
solución que contiene glucosa y la isomerasa para producir
la fructosa conveniente y mayores gastos por las dimensio-
nes del equipo que se requiere para contener la capa de isome
10 rasa ligada. Además, a medida que la profundidad de la capa
aumenta, ésta muestra una mayor tendencia a consolidarse,
debido a las altas presiones que deben aplicarse para pasar
por ella la solución que contiene glucosa. Por ejemplo, en
una capa relativamente poco profunda, ésta sólo puede conso
15 lidarse en pequeño grado, en tanto que en una capa de mayor
profundidad la consolidación puede ser mucho más grande. -
Cuando esto ocurre, la caída de presión a través de la ca-
pa aumenta en tal proporción que la presión necesaria para
pasar la solución de glucosa por la capa puede ser extraor-
20 dinariamente alta y puede ser tan elevada que no es posi-
ble usar, para contener la capa, el equipo que se constru-
ye comúnmente.

El valor de estabilidad de la isomerasa de glu-
cosa ligada debe ser cuando menos de 50 horas, de preferen-
cia y cuando menos de 300 horas y, más preferentemente y -
25 cuando menos, de 400 horas.

La elaboración de la isomerasa de glucosa ligada
puede efectuarse de cualquier manera conveniente, mientras
la isomerasa de glucosa ligada tenga las características an-
tes expuestas. Se considera que la isomerasa de glucosa -
30 puede ligarse a una diversidad de vehículos inertes. Por -



415711

1 ejemplo, la isomerasa de glucosa puede ligarse a DEAE-celulosa (celulosa de dietilaminoetilo) o a un material semejante, obteniéndose resultados excelentes. Naturalmente, para lograr la aglutinación, la isomerasa de glucosa debe separarse de las células, sin que haya sustancias que entorpezcan la aglutinación. Esta puede efectuarse en un medio acuoso o en una solución de azúcar, v.gr.: jarabe de maíz. Asimismo, la isomerasa de glucosa puede ligarse dentro de vehículos inertes, junto con un material celular o en estado relativamente puro. Varios materiales poliméricos pueden ser apropiados a este fin y, desde luego, la porosidad de dichos materiales debe ser de tal naturaleza que permita el contacto de la glucosa con la isomerasa de glucosa.

5
10
15
20
25
30

Cuando la isomerasa se liga a un vehículo finamente dividido, como la DEAE-celulosa, es preferible aplicar el presente procedimiento haciendo pasar la solución que contiene glucosa a través de una capa relativamente superficial de la misma. Por ejemplo, se considera que la profundidad de la capa de isomerasa de glucosa ligada sea de una fracción de centímetro a 12,70 cms. Sin embargo, el área seccional transversal de la capa debe ser grande. De preferencia, la proporción entre la profundidad y la anchura de la capa debe ser de 0,01 a 0,1 y, más preferentemente, de 0,02 a 0,05, lo cual depara las ventajas de que la caída de la presión a través de la capa sea pequeña y de que la consolidación de la capa sea mínima. No obstante, como la capa es relativamente poco profunda, hay una mayor tendencia a la canalización, la cual redundaría en un uso ineficiente de la isomerasa de glucosa. Si cuando menos dos capas y, de preferencia y cuando menos seis capas, de isomerasa de glu-



1 cosa ligada se colocan en serie y se establecen los medios
para mezclar el efluente que procede de una capa anterior,
antes de que pase por una capa subsiguiente, cualquier ca-
nalización que pudiera presentarse no produciría un efecto
5 serio en la eficiencia del presente procedimiento.

Un aparato que se conoce en la técnica y que pue-
de emplearse a este propósito es un filtro de hojas de pre-
sión, el cual comprende un conjunto de elementos (hojas) -
filtradores planos sostenidos verticalmente o en sentido -
10 horizontal en un tanque cilíndrico. Las hojas pueden ser -
circulares o rectangulares y estar provistas de superficies
filtradoras en ambos lados. El tanque cilíndrico puede te-
ner su eje largo horizontal o vertical. Una hoja de filtro
puede constar de un tamiz pesado o de una placa acanalada
15 sobre la cual encaja un medio de filtro, por ejemplo, una
tela tejida o una malla fina de alambre. La isomerasa de glu-
cosa ligada a un vehículo inerte puede mezclarse en una so-
lución que contiene glucosa, siendo bombeada dicha mezcla
a través del filtro de hoja de presión, de manera que, cu-
20 bra uniformemente cada hoja con la enzima ligada. La pre-
sión que se aplica a la solución, en el caso de un filtro
de presión de hoja vertical, sostiene la isomerasa de glu-
cosa ligada a las hojas. En seguida, una solución que con-
tiene glucosa se bombea a través del filtro de hojas de pre-
25 sión y mientras pasa por cada capa de isomerasa de glucosa
ligada ocurre la isomerización. La cantidad de fructosa que
se forme dependerá del período de tiempo en que la solución
de glucosa esté en contacto con la enzima ligada.

30 La composición exacta de la solución que contiene
glucosa isomerizada varía de acuerdo con las condiciones en

415711

-13 -



1 las cuales se lleve a cabo el presente procedimiento. En la Tabla I, que aparece en seguida, se muestran las características esenciales de las soluciones que contienen glucosa isomerizada, producidas por el presente invento.

5 TABLA I
CARACTERISTICAS DE SOLUCIONES NO REFINADAS QUE CONTIENEN

FRUCTOSA - PORCENTAJE EN SECO

	<u>Glucosa*</u>	<u>Fructosa*</u>	<u>Polisacáridos*</u>	<u>Psicosa</u>	<u>Ceniza**</u>	<u>Unidades de color</u>
10	30 a 60	10 a 54	0 a 50	0 a 1	0,1 a 0,5	0 a 2,0
	30 a 60	10 a 54	0 a 30	0 a 0,5	0,1 a 0,2	0 a 0,05
15	30 a 60	10 a 54	0 a 30	0 a 0,1	0,05 a 0,1	0 a 0,3

* La cantidad del sacárido depende principalmente del producto que se desee.

** Compuesta principalmente por sales metálicas que están presentes durante la isomerización para estabilizar y/o activar la isomerasa de glucosa.

20 Con el fin de describir con más claridad la naturaleza del presente invento, se ofrecen a continuación - ejemplos específicos. Empero, debe entenderse que éstos sólo se exponen a manera de ejemplo y que no se tiene el propósito de delinear el alcance del invento ni limitar la extensión de las cláusulas adjuntas.

25 EJEMPLO I

Este ejemplo ilustra el uso de la isomerasa de glucosa ligada a la DEAE celulosa, para convertir continuamente la glucosa en fructosa.

30 El Streptomyces Sp ATCC 21175, se desarrolla en -

415711

- 14 -



1 condiciones aerobias sumergidas y luego se separa por fil-
tración del caldo de fermentación. Un kilogramo de la tor-
ta de filtro se mezcla en 5 litros de agua desionizada, a
5 la cual se agregan 50 ml. de CoCl 0,1M y 8g de un detergen-
te catiónico (Arquad 18-50, de Armour Industrial Chemical -
Co.). La temperatura de la mezcla se mantiene a 60° C y el
pH se mantiene entre 6,7 y 6,8. Después de 3,75 horas de -
agitación, la mezcla se filtra al vacío a través de un pa-
pel filtro Whatman # 1. El filtrado se concentra por evapo-
10 ración al vacío a 30 IGIU/ml.

Quinientos mililitros del filtrado concentrado se
diluyen a 1500 ml. con agua desionizada. Cinco gramos de la
DEAE-celulosa (Cellex-D, fabricada por Bio-Rad Laboratories)
se agregan al filtrado, se agita durante media hora y se fi-
15 tra a través de un papel filtro Whatman # 1 en un filtro al
vacío. La torta de filtro se lava con agua mientras está
en el filtro y los lavados se colectan con el filtrado. La
torta de filtro contiene principalmente un material que no
es isomerasa. El filtrado purificado contiene 9,2 IGIU/ml.

20 Treinta gramos de la DEAE celulosa se suspenden
en 1500 ml. de agua, se agitan vigorosamente y la suspensión
reposa de 30 a 45 minutos. La suspensión flotante se decan-
ta para separar los "finos" de DEAE-celulosa. Lo anterior
se repite cuatro veces y, en seguida, la suspensión se filtra
25 al vacío. Veinte gramos (en seco) de la torta de filtro de
DEAE-celulosa se incorporan al filtrado purificado que con-
tiene 9,2 IGIU/ml y se agitan durante media hora a tempera-
tura ambiente. La suspensión se filtra y se recupera una tor-
ta de filtro húmeda, que contiene la DEAE-celulosa con la -
30 isomerasa absorbida en ella. La torta de filtro húmeda con-

415711

9



1 tiene 215 IGIU/g 6,25 g de la torta se mezclan en 50 ml. -
de una solución acuosa que contiene 0,001 moles de CoCl_2 -
por litro, 0,005 moles de MgSO_3 por litro y 0,1 mol de NaCl
por litro. Esta mezcla se vierte en una columna que tiene un
5 diámetro de 1 cm. y se deja asentar. La porción inferior de
la columna contiene una capa poco profunda de lana de vidrio
para retener la DEAE-celulosa. La salida inferior de la co-
lumna se abre y cuando la altura de la capa de la DEAE-celu-
losa es de 25 cm., 350 ml. de una solución acuosa que con-
10 tiene 0,001 moles de CoCl_2 por litro, 0,005 moles de MgSO_3
por litro y 0,1 mol de NaCl por litro, pasa a través de la
capa para eliminar los materiales coloreados y otras impure-
zas de la DEAE-celulosa.

15 Una solución de glucosa a un pH de 6,5, que con-
tiene 3 moles de glucosa por litro, 0,001 moles de CoCl_2 -
por litro y 0,005 moles de MgSO_3 por litro, pasa a través
de la columna a razón de 0,2 ml/min. La temperatura de la
columna se mantiene a 60° C. La conversión de glucosa en -
fructosa, después de 6 horas, es de 49,6 por ciento y, des-
20 pués de 186 horas, de 45,0 por ciento. El valor de estabi-
lidad es de 198 horas.

EJEMPLO II

25 Este ejemplo ilustra el uso de isomerasa de glu-
cosa ligada a una resina sintética y porosa de intercambio
aniónico, para convertir glucosa en fructosa de una manera
continua.

La isomerasa de glucosa se separa de las células
de *Streptomyces Sp ATCC 21175* y se purifica del modo que se
describe en el Ejemplo I.

30 Cien gramos de Amberlite IRA-938 (Rohm & Haas) se

415711

- 16 -



1 ponen en una columna que tiene un diámetro de 2,6 cm. La -
altura de la capa de Amberlite IRA-938 es de 37 cm. La co-
luna se mantiene a 60° C. La columna es tratada haciendo
5 pasar por ella, en sucesión, 500 ml. de NaOH 1,5N, 1000 ml
de agua desionizada, 1000 ml de NCl 2M y 1000 ml de agua -
desionizada. A 1480 ml de una solución parcialmente purifi-
cada de la isomerasa de glucosa, purificada de acuerdo con
el Ejemplo I, a una temperatura de 50° C, se incorporan 100
10 g. de Amberlite IRA-938. La solución se agita durante dos
horas y luego se filtra. El filtrado se cuela a través de
la capa de Amberlite IRA-938 a razón de 3 ml/min. En segui-
da, se lava la capa con 100 ml. de agua desionizada. La ca-
pa contiene 3430 IGIU.

15 Una solución que contiene glucosa a un pH de 6,5
y que contiene 3 moles de glucosa por litro, 0,001 moles de
CoCl₂ por litro y 0,005 moles de MgSO₃ por litro, pasa a -
través de la capa a razón 3,6 ml/min. La temperatura de la
columna se mantiene a 60° C. El grado de conversión de la
20 glucosa en fructosa es de 21,9 por ciento, después de que la
columna ha funcionado durante 41 horas y de 19,5 por ciento
a las 210 horas. El valor de estabilidad se calcula en al-
rededor de 600 horas.

25 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta, deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

30 1. Un procedimiento para convertir enzimáticamente
glucosa en fructosa, que se caracteriza por: elaborar una
solución que contiene glucosa, con una viscosidad de 0,5 a
100 centipoises, un pH de 6 a 9 y que contiene de 5 a 80 -
por ciento de glucosa por peso; mantener la solución a una

415711

- 17 -

29 AGO



1 temperatura de 20° a 80° C, mientras se hace pasar la solu-
ción a través de una capa de isomerasa de glucosa ligada, -
que tiene una actividad de isomerasa de glucosa de 3 IGIU -
cuando menos por centímetro cúbico de capa y un valor de -
5 estabilidad mínimo de 50 horas a una proporción de circula-
ción por la cual alrededor del 54 por ciento de glucosa se
convierte en fructosa, el color de la solución vertida au-
mente en menos de 2 unidades de color y no hay una produc-
ción considerable de psicosa.

10 2. Un procedimiento como el que se describe en la
reivindicación 1, caracterizado porque la viscosidad de la
solución que contiene glucosa es de 2 a 20 centipoises y el
pH de la solución es de 6,5 a 8.

15 3. Un procedimiento como el que se describe en -
las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la solu-
ción que contiene glucosa contiene del 40 al 60 por ciento
de glucosa por peso y en que el pH de la solución es de 7 a
8.

20 4. Un procedimiento como el que se describe en -
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por
que la capa de isomerasa de glucosa ligada contiene, cuan-
do menos, 20 IGIU por centímetro cúbico de capa.

25 5. Un procedimiento como el que se describe en -
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por-
que el valor de estabilidad de la isomerasa de glucosa li-
gada es de 300 horas, cuando menos.

30 6. Un procedimiento como el que se describe en la
reivindicación 5, caracterizado porque el valor de estabi-
lidad de la isomerasa de glucosa ligada es, cuando menos de
400 horas.

ME

