



16 OCT 1975

441026

P.- 61.379

Case D-18
HL- 41548

NO. 0074

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CPC INTERNATIONAL INC.

entidad norteamericana

establecida en International Plaza, Englewood Cliffs,
Nueva Jersey, Estados Unidos de América

por: " UN METODO DE ISOMERIZAR PARCIALMENTE UNA SOLUCION
DE GLUCOSA A UNA SOLUCION DE FRUCTOSA "

4.10.75



Esta invención se refiere en general a la fijación de enzimas catalíticamente activas sobre materiales soporte esencialmente insolubles en agua. Específicamente, la invención se refiere a la adsorción de glucosa-isomerasa sobre las superficies interiores de un soporte inorgánico poroso de área superficial elevada, constituido por una mezcla de los óxidos metálicos MgO y Al₂O₃.

Debido a la especificidad catalítica de las enzimas, se ha prestado considerable atención hacia la búsqueda de métodos de utilización de las mismas tanto en aplicaciones de laboratorio como en aplicaciones industriales. Las enzimas son generalmente insolubles en agua, y, por esta razón, muchas enzimas son antieconómicas en lo que se refiere a su utilización en operaciones del tipo por cargas en gran escala, dado que las enzimas pueden utilizarse por regla general sólo una vez en ausencia de etapas de recuperación y purificación de enzimas, que son bastante costosas. En los años recientes, sin embargo, se han ideado técnicas para la fijación de enzimas activas sobre materiales soporte esencialmente insolubles en agua que pueden separarse fácilmente de una reacción, permitiendo así la reutilización de la enzima insolubilizada o inmovilizada. Esta descripción trata de una nueva composición de glucosa-isomerasa inmovilizada que exhibe un alto grado de actividad enzimática por unidad de peso de la composición.



La glucosa - isomerasa es una enzima que cataliza la isomerización del azúcar glucosa al azúcar fructosa, a la que a veces se hace referencia como levulosa. La conveniencia de la conversión de glucosa en fructosa está perfectamente reconocida por diversas razones. Por ejemplo, aun cuando la fructosa tiene el mismo poder calorífico que la glucosa, es un azúcar más dulce. Así, con fructosa se puede conseguir un grado de dulzor fijado con un aporte de calorías relativamente más bajo. Además, el azúcar glucosa es relativamente abundante a partir de una diversidad de fuentes, y por esta razón es asequible como fuente de materia prima para la producción de fructosa.

Es bien sabido que la glucosa se puede isomerizar en fructosa por métodos tanto alcalinos como enzimáticos. La isomerización alcalina de la solución de glucosa requiere someter una solución que contiene glucosa a un medio alcalino en el que puede producirse la isomerización en fructosa. Desgraciadamente, la isomerización alcalina de la glucosa en fructosa ha dado resultados insatisfactorios, generalmente debido a la tendencia de los catalizadores alcalinos no selectivos a producir subproductos indeseables que afectan desfavorablemente al sabor del producto y que son difíciles de eliminar. Entre los subproductos indeseables conocidos de la isome-



16

rización alcalina se encuentran diversos cuerpos coloreados y productos ácidos que requieren etapas de tratamiento adicionales para su eliminación. Algunas de las desventajas asociadas con la isomerización alcalina se han vencido por el descubrimiento relativamente reciente de que puede utilizarse alúmina finamente dividida en un medio alcalino para la isomerización de la glucosa. Como se ha descrito en la técnica anterior, por la utilización de alúmina alcalina (pH mayor que 7) que tiene un área superficial elevada, se ha hecho posible evitar la formación de subproductos objetables. Una ventaja adicional descrita es que por la utilización de partículas sólidas de alúmina, la alúmina se puede separar con facilidad de un medio de reacción y puede volver a ser utilizada. Desgraciadamente, sin embargo, el uso de alúmina finamente dividida requiere un tiempo de residencia relativamente largo para la solución de glucosa, tendiendo así a excluir las reacciones continuas o de flujo directo, más económicas. Además, debido a un equilibrio que parece existir entre glucosa y fructosa, la conversión óptima de glucosa en fructosa está limitada en las condiciones de las reacciones de tipo por cargas que se describen en la técnica anterior.

A causa de los problemas asociados con la isomerización alcalina, se está prestando atención crecien-



te hacia los métodos de isomerización enzimática en que se utiliza glucosa-isomerasa. Tal como se utiliza en esta memoria, el término glucosa-isomerasa hace referencia a la enzima o al sistema de enzimas que cataliza la isomerización de glucosa en fructosa, cualquiera que sea la fuente de la(s) enzima(s). La enzima propiamente dicha puede derivarse de una diversidad de organismos, y se conocen numerosos métodos para la extracción y purificación de la glucosa-isomerasa. El uso de preparaciones solubles de glucosa-isomerasa para la fabricación de fructosa comercial en gran escala está limitado en general debido al coste de la enzima para una sola utilización y/o a los costes asociados con la recuperación o inactivación de la enzima soluble agotada. Por tales razones, se ha prestado atención recientemente hacia la búsqueda de métodos de fijación de enzimas sobre materiales soporte de área superficial elevada, esencialmente insolubles en agua, tanto orgánicos como inorgánicos.

Existe un cierto número de desventajas asociadas con el uso de soportes orgánicos como materiales soporte de enzimas. Por ejemplo, muchas sustancias orgánicas están sometidas al ataque de los microbios, en especial durante su utilización a largo plazo. Además, algunas de las sustancias orgánicas tienden a hincharse en un medio acuoso, acarreando así problemas de presión en



16

5 las operaciones en columnas de uso continuo. Aún más, muchas sustancias orgánicas carecen del área superficial elevada necesaria para asegurar una carga de enzima máxima y, debido a su naturaleza orgánica, muchos de tales soportes son difíciles de esterilizar por métodos convencionales. Muchas de las desventajas arriba indicadas se han resuelto por descubrimientos recientes que demuestran que ciertos materiales inorgánicos pueden utilizarse como materiales soporte de enzimas.

10 Métodos de adsorción de diversas enzimas sobre cierto número de materiales silíceos se describen en la técnica anterior. Métodos de copulación química de enzimas con una diversidad de materias inorgánicas por medio de un agente de copulación intermedio de silano se describen también en la técnica anterior. Más recientemente, en
15 la Patente de los EE. UU. Nº 3.850.751, se describe que podrían prepararse composiciones de enzimas fijadas muy eficientes por fijación de las enzimas a la superficie interior de materiales cerámicos porosos que tienen un
20 diámetro medio de poro menor que 1000 Å, preferiblemente menor que aproximadamente 500 Å o comprendido entre aproximadamente 100 Å y 500 Å. Seleccionando un diámetro de poro medio al menos tan grande como el tamaño de la enzima pero menor que aproximadamente 1000 Å, se describió
25 que se logra un área superficial elevada para una carga



de enzima alta, y que las enzimas fijadas interiormente tendrían a estar protegidas contra el desprendimiento, especialmente en medios de reacción turbulentos.

5 un método de isomerización de glucosa en fructosa con utilización de una composición que consiste en glucosa-isomerasa adsorbida sobre cuerpos de alúmina porosos que tienen un tamaño de poro medio comprendido entre aproximadamente 100 Å y 1000 Å. Como se describe en la patente
10 arriba citada, es sabido que se necesitan diversos iones metálicos en la isomerización enzimática de glucosa en fructosa.

En la técnica anterior se han examinado los efectos de diversos iones metálicos tales como Mg, Co, Fe, Mn, Ni, Ba, Ca, Zn y Cu, llegándose a la conclusión de que
15 la glucosa-isomerasa procedente de una cepa de Streptomyces sp. citada requiere la presencia tanto de iones cobalto como de iones magnesio para su actividad. Típicamente, la presencia de aquéllos y otros iones está asegurada por
20 adición de los mismos a la alimentación de glucosa antes de ponerla en contacto con un sistema de enzima fijada, como se muestra por los ejemplos de la patente arriba indicada. La adición de diversos iones metálicos al material de alimentación de glucosa requiere etapas de tratamiento
25 adicionales en la producción de fructosa con glu-



cosa-isomerasa fijada, especialmente en un reactor de flujo directo continuo (p. ej., una columna de flujo de relleno). Adicionalmente, cuando se añaden tales iones a la solución de alimentación, los mismos se convierten

5 en una parte del producto final. Esto es especialmente indeseable en el caso de iones tales como los de cobalto. Debido al hecho de ser indeseable la presencia de tales iones en el producto final, en especial en el caso de productos alimenticios, y debido a los costes adicionales asociados con la eliminación de tales iones, se ha

10 reconocido la necesidad de proporcionar un sistema de glucosa-isomerasa fijada que asegure la presencia de los iones metálicos necesarios y evite sin embargo los problemas asociados con los sistemas anteriores.

15 De un modo totalmente sorprendente, se ha encontrado que una parte de los requisitos de iones metálicos de un sistema de glucosa-isomerasa fijada y los parámetros de pH críticos de un tal sistema pueden cumplirse simultáneamente con un material soporte inorgánico poroso que tiene un intervalo de composición de óxidos metálicos muy crítico, que se describe en detalle más adelante.

20

La esencia de la presente invención es el descubrimiento de que puede lograrse una carga de enzima muy elevada por gramo de soporte para una composición de glu-

25



cosa-isomerasa fijada por incorporación de una cantidad crítica de MgO en un material soporte de la enzima constituido por Al_2O_3 poroso. Específicamente, se ha encontrado que puede prepararse una composición de glucosa-isomerasa fijada muy eficiente por adsorción de enzimas de glucosa-isomerasa a las superficies interiores de un soporte inorgánico poroso de área superficial elevada (como mínimo $5 \text{ m}^2/\text{g}$) que tiene un diámetro medio de poro comprendido entre aproximadamente 100 \AA y aproximadamente 1000 \AA y que contiene, en peso, entre $0,84 \%$ y $12,0 \%$ de MgO y entre $99,16 \%$ y $88,0 \%$ de Al_2O_3 , comprendiendo preferiblemente entre aproximadamente $0,84 \%$ y aproximadamente $3,80 \%$ de MgO. En realizaciones muy preferidas, el soporte de enzima de MgO- Al_2O_3 poroso se halla en forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula comprendido entre aproximadamente $4,76 \text{ mm}$ y 74 micras , preferiblemente entre 595 y 354 micras , estando comprendido el diámetro medio de poro entre aproximadamente 150 \AA y 250 \AA . Métodos para la preparación del soporte, y de la composición de glucosa-isomerasa fijada, así como métodos para la utilización de la composición para la preparación de fructosa se describen más adelante en esta memoria.

El método de utilización de la composición de glucosa-isomerasa fijada para isomerizar parcialmente la glucosa en una solución que contiene glucosa implica la



etapa de hacer reaccionar una solución acuosa de glucosa en condiciones de isomerización con la composición. Preferiblemente, la composición está constituida por moléculas de glucosa-isomerasa adsorbidas en las superficies interiores de una pluralidad de partículas porosas que tienen un tamaño medio de partícula comprendido entre aproximadamente 4,76 mm y 74 micras, estando contenida la composición en una columna de relleno de flujo directo a través de la cual se hace pasar continuamente la solución de glucosa, que contiene como mínimo 10 % en peso de glucosa, en condiciones de isomerización. Muy preferiblemente, el pH de la solución de glucosa, antes del paso de ésta a través de la columna, está comprendido entre aproximadamente 7,0 y 9,0, más preferiblemente entre 7,4 y 8,8, estando constituido el soporte inorgánico, en peso, por entre aproximadamente 0,84 y 3,80 % de MgO y 99,16 y 96,2 % de Al_2O_3 , y teniendo un diámetro medio de poro comprendido entre aproximadamente 150 Å y 250 Å y un tamaño medio de partícula comprendido dentro del intervalo de aproximadamente 595 a 354 micras.

La esencia de la presente invención radica en las propiedades químicas y físicas del soporte de glucosa-isomerasa y su utilización para fijar la enzima para la producción de fructosa a partir de una solución de glucosa. Específicamente, se ha encontrado que la canti-



dad de MgO en el soporte poroso de MgO-Al₂O₃ es crítica para proporcionar un soporte de área superficial elevada que tenga un pH y una capacidad de carga óptimos para las enzimas de glucosa-isomerasa y que pueda satisfacer también en parte los requisitos de iones metálicos de las enzimas. Debe ponerse de relieve el hecho de que el soporte de la presente invención constituye una mejora sobre el descrito en la Patente Española 422.764, arriba considerada. En dicha patente se indicaba que el diámetro medio de poro del Al₂O₃ poroso debía estar comprendido entre aproximadamente 100 Å y 1000 Å, muy preferiblemente entre aproximadamente 140 Å y 220 Å. Debido a ligeras diferencias en la fabricación de los soportes de la presente invención, que requieren la adición de una cantidad crítica de MgO, se ha encontrado que el diámetro medio de poro preferido está comprendido dentro del intervalo de 150 Å a 250 Å. La mejora específica con respecto al soporte de la patente arriba indicada reside en el descubrimiento de que los iones de magnesio que son esenciales para la glucosa-isomerasa pueden incorporarse en el soporte de alúmina poroso, tal como en la forma de óxido de magnesio, a fin de que el magnesio se encuentre en estrecha proximidad con la glucosa-isomerasa adsorbida en la superficie del soporte. Aun cuando el mecanismo exacto por el cual el magnesio contribuye a la acción catalítica de



la glucosa-isomerasa no se conoce con exactitud, se ha encontrado que al menos se obtienen cuatro ventajas claras cuando se incorporan pequeñas cantidades controladas de MgO en la matriz de alúmina porosa:

- 5 (1) el pH del microambiente en el interior del soporte del cuerpo poroso y el pH del sustrato o alimentación pueden controlarse con respecto a las necesidades de la enzima;
- 10 (2) la cantidad de glucosa-isomerasa activa fijada se puede aumentar sustancialmente con respecto a y más allá de cualquier actividad asociada con el pre-tratamiento de la superficie con iones magnesio o la incorporación de iones magnesio en la alimentación;
- 15 (3) el factor de utilización de la enzima o la eficiencia de fijación pueden mejorarse con respecto a la cantidad de magnesio en el soporte poroso;
- (4) puede prolongarse la vida media de la enzima.

20 Se ha descubierto que el intervalo crítico, en peso, de MgO en el soporte de MgO-Al₂O₃ requerido para producir las mejoras globales está comprendido entre aproximadamente 0,84 % y 12,0 %. Preferiblemente la cantidad de MgO está comprendida entre 0,84 % y 3,80 %, y se ha
25 encontrado que se obtiene un soporte muy útil cuando la



cantidad de MgO está comprendida dentro del estrecho intervalo que va de 2,0 a 2,4 %.

Específicamente, se ha encontrado que cuando la cantidad de MgO es inferior a 0,84 % la aptitud adsorbente del soporte disminuye significativamente, mientras que por encima de 12,0 % de MgO desciende la actividad enzimática. Ambos efectos están relacionados con el contenido de MgO del soporte poroso y/o con su efecto subsiguiente sobre el pH del microambiente, como se muestra en los ejemplos que siguen.

El soporte inorgánico poroso de la enzima constituido esencialmente por cantidades variables de Al_2O_3 y MgO puede prepararse de una diversidad de maneras. Como se muestra en la Patente de los EE. UU. nº 3.850.751, sin embargo, el diámetro medio de poro del soporte inorgánico debería ser al menos tan grande como el de la enzima, pero menor que aproximadamente 1000 Å, muy preferiblemente menor que aproximadamente 500 Å o, si fuese posible, comprendido entre aproximadamente 100 Å y 500 Å. En el caso de la glucosa-isomerasa y de los presentes soportes, se ha encontrado que el diámetro medio de poro preferido debería estar comprendido entre aproximadamente 150 Å y 250 Å. De acuerdo con ello, en los ejemplos que siguen, se dan instrucciones específicas para la preparación de soportes porosos de $MgO-Al_2O_3$ que tienen un

1600



5 diámetro medio de poro comprendido dentro de este intervalo. Se dan instrucciones adicionales para la fijación de la glucosa-isomerasa sobre los soportes para formar las composiciones de glucosa-isomerasa fijada. Se describen también métodos para la utilización de la glucosa-isomerasa fijada para isomerizar la glucosa en fructosa.

10 El método general para preparar los soportes porosos de $MgO-Al_2O_3$ implica partir de partículas de alúmina que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente $300 \text{ \AA} \pm 200 \text{ \AA}$. Estas partículas se mezclan luego con una solución constituida por cantidades o concentraciones variables de iones magnesio para formar una suspensión espesa que se mezcla bien. Los iones magnesio se pueden añadir procedentes de una diversidad de fuentes asequibles tales como $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ó $Mg(OH)_2$. La suspensión espesa se seca luego suavemente para eliminar el agua. Esta etapa de secado tiende a contraer las partículas individuales en conjunto, de tal modo que el producto secado final es poroso y tiene un tamaño medio de poro que es aproximadamente igual al tamaño medio de partícula de los materiales de partida. El secado suave puede llevarse a cabo por la vía de cierto número de métodos tales como secado simple con aire, secado con calentamiento moderado (aproximadamente a $100^\circ C$), secado por pulverización de la suspensión espesa, y mé-

15

20

25



todos similares. El requisito principal en la etapa de secado es que el mismo sea lo suficientemente suave para preservar la estructura de poro del esqueleto formada cuando las partículas se contraen en conjunto.

5

Después del secado, el cuerpo poroso se refuerza calcinándolo a una temperatura inferior al punto de sinterización; por ejemplo, por calcinación a aproximadamente 400°C a 600°C durante aproximadamente 1 a 16 horas.

10

El producto resultante puede triturarse después, si es necesario, y las partículas porosas individuales se pueden clasificar de acuerdo con el intervalo de tamaños de grano deseado, el cual está comprendido deseablemente entre 4,76 mm y 74 micras, preferiblemente entre 595 y 354 micras. Alternativamente, la suspensión espesa puede secarse por pulverización al intervalo de tamaños de grano deseado antes de la calcinación.

15

20

Una vez que se han preparado las partículas porosas, las mismas se pueden utilizar para fijar las moléculas de glucosa-isomerasa por adsorción a las superficies internas de los cuerpos porosos. Utilizando partículas porosas que tengan un diámetro medio de poro menor que 1000 Å, con tamaños de partícula de 595 a 354 micras, se asegura un área superficial muy elevada por gramo (por ejemplo, mayor que aproximadamente 5 m²/g) para una carga máxima de enzima. Se ha encontrado que la carga de en-

25

5 zima se aumenta de modo importante si, antes de la adsorción de las enzimas, se hacen reaccionar los soportes con una solución acuosa de citrato (por ejemplo, ácido cítrico o solución de citrato de sodio 0,1 molar, de pH 7,0).

10 El procedimiento general de adsorción de la enzima lleva consigo mezclar las partículas porosas con una solución acuosa de glucosa-isomerasa constituida por entre aproximadamente 1 y 2 ml de preparación de la enzima por gramo de soporte poroso lavado y húmedo. Preferiblemente, la preparación de la enzima está muy concentrada y contiene desde aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 IGIU por ml. Preferiblemente, la etapa de adsorción tiene una duración de 2 horas como mínimo, dependiendo de factores tales como el tamaño de las partículas porosas, la concentración de la solución de enzima, y análogos. Una vez que la enzima ha quedado fijada de este modo, la composición resultante puede almacenarse, preferiblemente en agua, o como una pasta húmeda, hasta el momento de su utilización.

20 Durante su empleo, la composición se hace reaccionar con una solución que contiene glucosa tamponada a un intervalo de pH en el que se produce la isomerización óptima. El pH debe ajustarse hasta dejarlo comprendido entre 7,0 y 9,0, preferiblemente entre 7,4



y 8,8. En la solución de glucosa pueden utilizarse diversos tampones, conocidos por los expertos en la técnica.

5 En un sistema preferido de procedimiento continuo, las partículas de la composición se disponen en una columna de relleno de flujo directo (partículas de 595 a 354 micras, que tienen un diámetro medio de poro comprendido entre 150 Å y 250 Å) a través de la cual se hacen pasar continuamente una solución tamponada que
10 contiene al menos aproximadamente 10 % en peso de glucosa. Preferiblemente, la concentración de la solución de glucosa es al menos aproximadamente de 30 % en peso. El caudal a través de la columna, se ajusta para asegurar una isomerización máxima; p. ej., aproximadamente
15 42 % a 50 % de conversión de la glucosa en fructosa.

A continuación se dan métodos preferidos para la fabricación del soporte y de las enzimas fijadas. Las partículas de alúmina utilizadas para formar los cuerpos porosos de $MgO-Al_2O_3$ se obtuvieron comercialmente y
20 tenían las características siguientes:

Area superficial: 100 ± 20 m²/g

Diámetro medio de partícula (Å): 300 ± 200

pH de la suspensión acuosa al 10 % en peso: 4,4

Densidad relativa: 3,6 g/cm³

25 Nota: Análisis por rayos X indican aproximada-



mente 90 % de gamma-alúmina.

La fuente de glucosa-isomerasa soluble era una preparación cruda que contenía aproximadamente 2700 Unidades Internacionales de Glucosa-Isomerasa (IGIU) por
5 ml, donde una IGIU representa la actividad de enzima necesaria para producir un μ mol de fructosa por minuto a 60° C, a pH 6,85 a partir de una solución 2 M de glucosa. Una vez que se fijaron las enzimas se encontró que el intervalo óptimo de pH para la isomerización estaba
10 comprendido entre 7,4 y 8,8 y, debido al límite superior de pH, la cantidad de MgO en el soporte tiene que limitarse a no más que aproximadamente 12,0 % en peso como se indica a continuación. Las cantidades relativas de MgO en cada soporte se determinaron por análisis químico
15 por vía húmeda o por espectroscopía de llama. Se realizaron ensayos de actividad enzimática para cada composición de enzima de una manera modificada para reflejar el uso de una enzima no soluble y las variaciones de actividad que podrían encontrarse en una aplicación
20 comercial. Así, para todas las composiciones, se observó el comportamiento de las enzimas fijadas compactadas en una columna de 1,5 cm. de diámetro, a 60° C, utilizando una alimentación de glucosa al 50 % en peso (CereLOSE [®], sometida a cambio de catión) a pH 8,4,
25 que contenía MgCl₂ 0,005 M. La actividad se calculó co-

16 OCT



mo:

5

$$E = 27,9 \left(\frac{F}{W} \right) \ln \left(\frac{1}{1 - x/x_e} \right)$$

donde E = unidades de actividad, F = caudal (ml/h),
W = peso de enzima fijada (g, en base seca), x = % de fructosa, y x_e = % de fructosa en el equilibrio (51,2 %)

10

Preparación de Soportes que Tienen Cantidades Variables de MgO

Se prepararon diez muestras de soporte constituidas por alúmina y de 0 % a 28,6 % de MgO (en peso). Los ingredientes respectivos y las formas de las partículas de cada muestra de soporte se indican en la Tabla I, a continuación. Utilizando las cantidades que se indican en la Tabla, se prepararon las muestras de soporte añadiendo en primer lugar a las cantidades indicadas de agua destilada o desionizada suficiente ácido acético glacial para llevar la solución a una concentración 0,1 molar. Se formó luego una suspensión espesa por adición de las cantidades indicadas de alúmina con agitación enérgica. Se continuó la agitación hasta que se obtuvo una mezcla cremosa suave, aproximadamente durante 15 a 30 minutos. Se ajustó luego el pH hasta dejarlo

15

20

25



comprendido entre 2,0 y 3,0 y se añadió el compuesto de magnesio indicado a la mezcla de suspensión espesa, bien en forma líquida, o en estado sólido, Esta mezcla se homogeneizó luego a gran velocidad durante un período de tiempo adicional, aproximadamente de 15 a 30 minutos. La mezcla homogeneizada resultante se conformó después en partículas o esferas, según se indica, por colada en estado de barbotina o mediante secado por pulverización, respectivamente. El material colado en estado de barbotina se trituró luego y se clasificó de acuerdo con el tamaño de partícula indicado por medios convencionales. Tanto el material colado en estado de barbotina como el material secado por pulverización se calcinaron a 600° C durante 16 horas. Antes de la adsorción de las enzimas, se determinó el efecto de las adiciones de MgO sobre el "pH" de los soportes, mezclando 1 gramo de cada soporte con 9 gramos de agua destilada durante aproximadamente 15 minutos para alcanzar un equilibrio, y determinando luego el pH de la mezcla con un medidor convencional de pH.

TABLA I

(Cuerpos porosos)

Muestra Nº	Ingredientes				Producto Final		
	Cantidad de H ₂ O	Cantidad de Al ₂ O ₃	Cantidad de MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cantidad de Mg(OH ₂)	Forma de Soporte (595-354 micras)	pH	% de MgO (pe- so)
1*	221,8	181,4	0	0	Esferas	4,4	0
2**	100	100	0	0	Partículas	4,4	0
3**	100	99,16	4,3	0	Partículas	7,0	0,84
4*	110,7	90,7	6,44	0	Esferas	7,5	1,4
5*	110,7	90,7	10,1	0	Esferas	8,2	2,2
6*	110,7	90,7	13,3	0	Esferas	8,1	2,9
7*	110,7	90,7	17,5	0	Esferas	8,4	3,8
8**	100	100	0	10,3	Partículas	8,8	6,65
9**	100	100	69,2	0	Partículas	8,9	12,0
10**	100	100	0	58,1	Partículas	9,3	28,6

* kilogramos

** gramos

Nota: Todos los cuerpos porosos tenían un diámetro medio de poro comprendido dentro del intervalo de 150 a 250 Å y un tamaño medio de partícula de 595 a 354 micras.





16

Fijación de las Enzimas

Se utilizaron todas y cada una de las muestras de soporte anteriores para fijar la glucosa-isomerasa haciendo reaccionar la preparación de la enzima con cada soporte para adsorber la enzima sobre las superficies interiores de los poros. La cantidad de preparación de enzima utilizada correspondía a aproximadamente 15 ml de la preparación de enzima por cada 15 gramos de soporte. Antes de la etapa de adsorción real, cada muestra de soporte se lavó inicialmente con agua destilada por fluidización de la muestra de soporte en una columna. Los soportes lavados se hicieron reaccionar luego con una solución de citrato 0,1 molar en un baño de agitación durante una hora. A continuación se añadió la preparación de enzima y se dejó que transcurriese la adsorción durante aproximadamente 24 horas, con agitación para facilitar el procedimiento de adsorción. El producto final se enjuagó luego con agua destilada, y las muestras individuales se ensayaron como se ha indicado arriba, con los resultados siguientes, en los que E_0 representa la actividad enzimática por gramo determinada como se ha descrito arriba y E_0 (equivalente) representa un valor normalizado asociado con una carga incrementada observada utilizando las partículas de forma irregular (compárese con las esferas).



TABLA II

Actividad/gramo, en función de % MgO + pH del Soporte + Forma del Soporte

Muestra N°	% MgO	pH	Forma	E _o	E _o (equivalente)
1	0	4,4	Esferas	203	203
2	0	4,4	Partículas	387	(200)
3	0,84	7,0	Partículas	805	(600)
4	1,4	7,5	Esferas	650	(650)
5	2,2	8,2	Esferas	898	898
6	2,9	8,1	Esferas	899	899
7	3,8	8,4	Esferas	909	909
8	6,65	8,8	Partículas	916	(720)
9	12,0	8,9	Partículas	768	(600)
10	28,6	9,3	Partículas	200	(50)



Para ser comercialmente factible, la glucosa-
isomerasa fijada debe tener una carga enzimática de al
menos aproximadamente 500 unidades de actividad por gra-
mo de soporte en un procedimiento de isomerización con-
5 tinuo (de flujo directo). Como se puede ver en la Tabla
II, se obtiene este nivel de carga cuando el % en peso
de MgO en el soporte poroso de MgO-Al₂O₃ está compren-
dido dentro del intervalo de aproximadamente 0,84 a apro-
ximadamente 12,0% de MgO, obteniéndose los resultados óp-
10 timos cuando el soporte está constituido por aproximada-
mente 0,84 a 3,8% de MgO. Aun cuando no se conoce por
completo el mecanismo o mecanismos exactos por los cua-
les el contenido de MgO da como resultado una carga me-
jorada, puede apreciarse a partir de los datos conteni-
15 dos en la Tabla II que el pH del soporte puede desempe-
ñar cierta función en la determinación de la cantidad
de carga, ya que la carga mínima deseada de al menos 500
unidades de actividad por gramo se presenta en soportes
que tienen un pH comprendido dentro del intervalo de
20 7,0 a 8,9. Por tanto, se cree que la adición de MgO pue-
de servir no sólo para satisfacer una parte de las ne-
cesidades de Mg⁺⁺ de las enzimas, sino también para ajus-
tar los parámetros de pH del soporte que limitan tanto
las cargas superiores como las inferiores. No obstante,
25 a partir de los datos arriba indicados se puede llegar a

la conclusión de que la cantidad de MgO en el soporte po-
roso de MgO-Al₂O₃ es realmente crítica y que la cantidad
crítica de MgO está comprendida dentro del intervalo de
aproximadamente 0,84 a 12,0% en peso, preferiblemente den-
5 tro del intervalo de aproximadamente 0,84 a aproximadamen-
te 3,8%.

La presente solicitud, que corresponde a la pre-
sentada en los Estados Unidos de América el 18 de Septiem-
bre de 1974, con el número 507.209, se acoge a los benefi-
10 cios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad
Industrial.

REIVINDICACIONES

15

Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Pa-
20 tente de Invención en España, por VEINTE años, son los
que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un método de isomerizar parcialmente una
solución de glucosa a una solución de fructosa, caracte-
rizado por el hecho de que se hace reaccionar la solu-
25 ción de glucosa con una composición de enzima fijada

9-2-77

- 25 -



constituida por moléculas de glucosa-isomerasa adsorbidas a la superficie interna de un material soporte inorgánico poroso de área superficial elevada que tiene un diámetro medio de poro comprendido entre aproximadamente 100 Å y 1000 Å y que está constituido, en peso, por entre aproximadamente 0,84 a 12,0% de MgO y entre aproximadamente 99,16% a 88,0% de Al₂O₃.

2ª.- El método de la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el material soporte inorgánico poroso está constituido por una pluralidad de partículas que tienen un tamaño medio de partícula comprendido entre aproximadamente 4,76 mm y 74 micras, estando contenidas las partículas en una columna de relleno de flujo directo a través de la cual se hace pasar continuamente una solución de glucosa.

3ª.- El método de la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que las partículas tienen un diámetro medio de poro comprendido entre aproximadamente 150 Å y 250 Å.

4ª.- El método de la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que las partículas están constituidas por entre aproximadamente 0,84 y 3,8% de MgO y entre aproximadamente 99,16 y 96,2% de Al₂O₃, en peso.

5ª.- El método de la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que las partículas tienen un ta

maño medio de partícula comprendido entre aproximadamente 595 y 354 micras.

5 6ª.- El método de la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que antes de su paso a través de la columna el pH de la solución de glucosa está comprendido entre aproximadamente 7,0 y 9,0.

7ª.- El método de la reivindicación 6ª, caracterizado por el hecho de que el pH está comprendido entre aproximadamente 7,4 y 8,8.

10 8ª.- El método de la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que las partículas están constituidas en peso por entre aproximadamente 0,84 y 3,8% de MgO y entre aproximadamente 99,16 y 96,2% de Al₂O₃, tienen un tamaño medio de partícula comprendido entre aproximadamente 595 y 354 micras, y un diámetro medio de poro comprendido entre aproximadamente 150 Å y 250 Å y, antes de su paso a través de la columna, el pH de la solución de glucosa está comprendido entre aproximadamente 7,0 y 9,0.

15 9ª.- El método de la reivindicación 8ª, caracterizado por el hecho de que antes de su paso a través de la columna el pH de la solución de glucosa está comprendido entre aproximadamente 7,4 y 8,8.

20 10ª.- Un método de isomerizar parcialmente una solución de glucosa a una solución de fructosa.

25

9-2-77

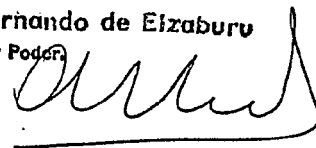
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 12. FEB. 1977

P.A.

Fernando de Elizaburu
Por Poder



9-2-77
MCC.

- 28 -

