



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 4-6014	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 12-3-76	

P.- 62.500

50377/AS

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO 558.001	13-3-75	EE.UU.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07B	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO CONTINUO PARA ISOMERIZAR JARABE DE GLUCOSA A UNA MEZCLA DE GLUCOSA Y FRUCTOSA"

71 SOLICITANTE (ES)

NOVO INDUSTRI A/S

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

NOVO Allé, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca

72 INVENTOR (ES)

Poul Børge Rosenius Poulsen y Lena Elizabeth Jensen de Zittan

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

1 La presente invención está dirigida en particular a un procedimiento continuo de isomerización de glucosa, caracterizado por costes de tratamiento bajos.

5 Virtualmente todas las glucosa-isomerasas conocidas en la técnica son activadas por cobalto, un factor que hace aumentar significativamente el coste de conversión del jarabe debido a que el cobalto añadido al jarabe de glucosa de partida, debe ser eliminado del producto de glucosa-fructosa mediante técnicas de cambio iónico de coste relativamente elevado.

10 Un estudio superficial efectuado sobre la glucosa-isomerasa procedente de B. coagulans (véase Danno y otros, Agriculture Biologic Chem., Vol. 31, N.º 3, 1967, páginas 284-292), describía que la actividad máxima de la enzima se observaba cuando la concentración de ión cobalto en el jarabe de glucosa era de aproximadamente $10^{-3}M$, y sugería una concentración algo superior para preparaciones de enzima brutas. La mayoría de la técnica de patentes posteriores a la fecha de este estudio parece haber adoptado tales niveles de uso para las enzimas que necesitan cobalto, con independencia de la fuente del microorganismo. Dado que el ión cobalto añadido al jarabe de glucosa de partida debe ser eliminado en último lugar del jarabe de glucosa-fructosa producido (mediante cambiadores de iones), cualquier reducción real en la cantidad de cobalto añadido al jarabe de partida se refleja en una reducción sustancial en el coste de purificación del jarabe de producto.

20
25
30 Se sabe también que la actividad de la enzima de B. coagulans resulta afectada por el contenido de ion magnesio del jarabe, y sin duda, comunmente ha sido empleada

1 en la técnica un contenido de magnesio elevado en el jarabe,
por ejemplo 10^{-2} M, independientemente de la fuente de la
enzima. Típicamente, un jarabe de glucosa que experimenta
isomerización enzimática según las prácticas de la técnica
5 anterior debe contener 10^{-3} M de Co^{++} y 10^{-2} M de Mg^{++} .

La purificación del jarabe posterior al tratamien
to está destinada, normalmente a eliminar el magnesio así
como el cobalto. No obstante, ya que el magnesio es un cons
tituyente no tóxico normal en alimentos, no se requiere la
10 ausencia virtual de magnesio.

Repitiendo, cualquier disminución significativa
en el uso de cobalto se refleja en costos de tratamiento
materialmente inferiores. La disminución en el uso de mag
nesio también se reflejará en costos de tratamiento inferior
15 res. Conforme a la invención no se usa en absoluto Co^{++} , y
según la práctica preferida de esta invención, el uso de la
adición de magnesio se reduce considerablemente.

EXPOSICION DE LA INVENCION

El método de esta invención comprende una isome
20 rización enzimática de un jarabe de glucosa con una concen
tración de 30-55% en peso de glucosa conteniendo menos de
aproximadamente 10^{-3} M de Ca^{++} , nada de Co^{++} , menos de apro
ximadamente 10^{-2} M de Mg^{++} , y de preferencia menos de $5 \times$
10⁻⁴ M, efectuándose la conversión a un pH comprendido en
25 tre 7,8 y 8,6, con un tiempo total de contacto entre la
enzima y el jarabe inferior a aproximadamente 3,5 horas,
de preferencia menos de 2 horas. Una práctica preferida
lleva consigo el tratamiento con tan poco magnesio añadi
do que puede evitarse el cambio iónico posterior a la iso
30 merización. El intervalo de temperatura conveniente para la

1 isomerización varía entre 60 y 85°C, prefiriéndose entre 60
y 70°C.

EXPLICACION DE LA INVENCION

5 Han sido investigadas intensamente glucosa-isome-
rasas procedentes de B. coagulans en un esfuerzo llevado a
cabo para obtener preparaciones enzimáticas con vidas me-
dias suficientemente largas para un proceso industrial con-
tínuo y que exhiban una alta actividad unitaria. En la ac-
tualidad se encuentran disponibles para la técnica glucosa-
10 -isomerasas de alta actividad y de vida prolongada proceden-
tes de células de B.coagulans. Para un modo preferido de
preparación enzimática en partículas adecuadas para la prác-
tica de esta invención, se hace referencia a los productos
enzimáticos descritos en la Solicitud de Patente española
15 Nº 440.521, presentada el 27 de Agosto de 1975, y a la co-
rrespondiente Patente Belga Nº 832.852, cuyas preparacio-
nes enzimáticas son células del microorganismo B.coagulans
reticuladas con glutaraldehído, que han sido sometidas a
una disrupción sustancial. Preferiblemente la preparación
20 enzimática se forma a partir de células que han sido homo-
geneizadas antes de la reacción con glutaraldehído.

El B.coagulans es una especie no bien definida
con numerosas variantes conocidas. Una variante producto-
ra de una glucosa-isomerasa superior se caracteriza por
25 una aptitud para desarrollarse solamente sobre fuentes
inorgánicas de nitrógeno como medio nutriente nitrogenado.
Para una descripción detallada de esta enzima y su microor-
ganismo originario se hace referencia a la solicitud de
patente de EE.UU. Nº 428.682, presentada el 27 de Diciem-
30 bre de 1973 y a la correspondiente Patente Belga Nº 809.546.

1 Se ha descubierto ahora que las necesidades bio-
químicas de cobalto de las enzimas glucosa-isomerasas de
B.coagulans inmovilizadas, pueden quedar completamente sa-
tisfechas sin suplemento alguno de cobalto durante el cur-
5 so de la isomerización. En realidad se ha encontrado que
omitiendo el Co^{++} del jarabe de glucosa, la productividad
del proceso de isomerización y la estabilidad de la enzima
no son perjudicadas y en algunos casos resultan mejoradas.

10 Como ya se ha mencionado, se ha descubierto tam-
bién que las necesidades bioquímicas de magnesio de la en-
zima glucosa-isomerasa son mucho más bajas de lo que se
había pensado hasta ahora. En realidad, la adición de Mg^{++}
puede ser evitada totalmente si la concentración de Ca^{++} es
15 baja. Las necesidades de activación de la de glucosa-isome-
rasa por Mg^{++} se satisfacen totalmente a un pH de 7,8 o ma-
yor, por menos de 10^{-3}M de Mg^{++} .

20 No obstante, los iones de calcio en el jarabe
son inhibitorios, acaso más de lo que ha sido apreciado
hasta la fecha. Apparently el Mg^{++} existente en el ja-
rabe actúa principalmente contrarrestando la inhibición del
 Ca^{++} . Un contenido de calcio bajo en el jarabe permite una
disminución en el contenido de magnesio. La relación $\text{Mg}^{++}/$
 Ca^{++} en el jarabe debe exceder de 5:1 sobre base molar, y
de preferencia, la relación debe exceder de 10:1, pero no
25 de 500:1, si $\text{Mg}^{++} > 10^{-3}\text{M}$.

30 La realización de una reacción enzimática de iso-
merización de glucosa por encima de un pH de aproximadamen-
te 8,0 es contrario, sin embargo, a las prácticas usuales
de isomerización a un pH inferior a aproximadamente 8,0 con
objeto de reducir la formación de color. La eliminación de

1 color del jarabe producido, por ejemplo por tratamiento con carbón activado, hace aumentar el coste del tratamiento.

La reducción al mínimo la formación de color es muy deseable. Desgraciadamente, el grado de formación de color en el jarabe de glucosa aumenta al aumentar el pH.

5 La investigación de la propensión a formar color, reveló que el grado de formación de color a todos los niveles de pH es en parte función del tiempo. En breve, el grado superior de formación de color a pH 8,0 ⁺ puede ser contrarrestado llevando a cabo la isomerización más rápidamente. Limitando el tiempo total de permanencia o de contacto del jarabe de glucosa en el reactor de conversión enzimática a un tiempo inferior a 3,5 horas aproximadamente, se obtiene un jarabe de color aceptable. Si el tiempo de contacto se limita a menos de 1 hora, el tratamiento de limpieza del color del jarabe obtenido como producto, puede llegar a ser innecesario, y además, la presencia de psicosa y otros subproductos no puede ser determinada mediante cromatografía de capa fina (Sven Åge Hansen, TLC method for the identification of mono, di and trisaccharides, Journal of Chromatography, en prensa).

15 La práctica de esta invención ofrece posibilidades de operación de tal modo que:

25 1) no se añade Co^{++} en relación con la isomerización;

2) no se necesita añadir Mg^{++} en relación con la isomerización;

3) no se necesita cambio iónico después de la isomerización para eliminar los iones perjudiciales;

30 4) la enzima exhibe una excelente estabilidad térmica.

1 mica;

5) la productividad del proceso mejora; y

6) el procedimiento es muy adecuado para la operación continua en columna; la caída de presión por unidad
5 de longitud de la columna es baja.

PRACTICA DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El procedimiento de la invención lleva consigo efectuar un tratamiento de isomerización de un jarabe de glucosa como una operación continua, con un pH de entrada
10 del jarabe comprendido entre 7,8-8,6 y un tiempo de contacto inferior a aproximadamente 3,5 horas, de preferencia menos de 2 horas. En el proceso continuo un jarabe de glucosa de 30-55% p/p se convierte en un jarabe de producto que contiene un nivel de fructosa deseado de por lo menos 40%,
15 habitualmente aproximadamente 45%. Las temperaturas de conversión se encuentran comprendidas entre 60-85°C, preferiblemente entre 60-70°C. El intervalo de pH de 7,8-8,6 en el jarabe de entrada que constituye la alimentación, se mantiene ajustándolo con álcali (NaOH ó Na₂CO₃) y si es necesario,
20 reajustándolo en puntos seleccionados en el reactor de conversión. El pH del jarabe isomerizado que sale, es inferior al pH del jarabe de entrada. Habitualmente la diferencia entre el pH del jarabe de entrada y el pH del jarabe de salida está comprendida entre 0,2 y 0,6. El control
25 del pH es importante para la práctica de la invención. Si el pH es demasiado alto, por ejemplo superior a aproximadamente 8,6 tiene lugar una formación de color indeseada (si el tiempo de contacto es largo). Si el pH es demasiado bajo, por ejemplo inferior a 7,6, se necesita la adición de Co⁺⁺
30 para mantener la actividad enzimática. Además de estos dos

1 efectos la variación de actividad enzimática con el pH ha de
ser considerada; el pH óptimo para la enzima del B.coagulans
está alrededor de 8,5. Un proceso discontinuo efectuado in-
dustrialmente se lleva a cabo con tiempos de contacto prolon-
5 gados debido al uso de concentraciones de enzima relativamen-
te bajas. Por esta razón el pH debe ser mantenido bajo con
objeto de evitar la formación de color, y la actividad de la
enzima a tal pH es considerablemente inferior a la existen-
te al pH óptimo. Se requiere la adición de Co^{++} . En un pro-
10 ceso continuo según la presente invención, el tiempo de con-
tacto puede ser mantenido bajo y el pH puede ser alto. La
isomerización puede efectuarse en el pH óptimo de la enzima
o muy próximo al mismo. El Co^{++} puede ser evitado. Por tan-
to un proceso continuo según la presente invención tiene di-
15 versas ventajas sobre un proceso discontinuo.

La cantidad de Mg^{++} añadido al jarabe de alimenta-
ción es menor de aproximadamente 10^{-2}M preferiblemente me-
nor de $5 \times 10^{-4}\text{M}$. Sin embargo, para permitir niveles bajos
de Mg^{++} el contenido de calcio del jarabe de alimentación
20 debe ser controlado por debajo de aproximadamente 10^{-4}M ,
lo que puede hacerse, por ejemplo, formando el jarabe a par-
tir de agua con poco calcio, o mediante tratamiento previo
apropiado del jarabe de glucosa para limitar el calcio a un
valor inferior a $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$. En cualquier caso, cuando se
25 encuentra presente calcio, se añade suficiente magnesio al
jarabe para desequilibrar su contenido de calcio, hasta que
se encuentra en exceso de una relación molar de $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$
de 5:1, preferiblemente superior a una relación molar de
 $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$ de 10:1.

30 En total el contenido de tanto Mg^{++} como Ca^{++} se

1 controla y relaciona, mediante eliminación por cambio ióni
co del Ca^{++} del jarabe de glucosa, si es necesario, para
evitar más de 10^{-3} M de Ca^{++} y de 10^{-2} M de Mg^{++} . Si el ja-
rabe de glucosa contiene una concentración inferior de Ca^{++} ,
5 la cantidad de Mg^{++} añadido puede ser disminuida en una
proporción apropiada tal que la relación $\text{Mg}^{++}:\text{Ca}^{++}$ permane-
ce dentro del intervalo de 5-500 para $\text{Mg}^{++} > 10^{-3}$ M y es ma
yor que 5 para $\text{Mg}^{++} < 10^{-3}$ M. Así, en una realización prefe
rida de esta invención los jarabes contienen menos de
10 $2,5 \times 10^{-5}$ M de Ca^{++} y 5×10^{-4} M de Mg^{++} .

Prácticamente, los jarabes de glucosa a los que
está dirigida esta invención proceden de un hidrolizado de
almidón. A menudo la preparación del jarabe comienza po-
niendo en suspensión almidón en un agua de grifo de alguna
15 dureza, y por consiguiente se encuentra presente algo de
 Ca^{++} .

Frecuentemente la hidrólisis del almidón y la sa
carificación del hidrolizado de almidón se llevan a cabo
enzimáticamente, usando enzimas activadas por Ca^{++} . Breve-
20 mente, el Ca^{++} raramente se encuentra ausente de jarabes
de glucosa (distintos de los preparados en un laboratorio
directamente partiendo de dextrosa cristalina con agua
desionizada), y debe tenerse cuidado para evitar que el
contenido de Ca^{++} exceda de 10^{-3} M de Ca^{++} .

25 En procesos de isomerización continuos conforme
a la invención, el tamaño de partícula de la preparación
enzimática se determinará por las condiciones de tratamien
to del jarabe (y de la instalación). Para una operación en
columna, que es un modo preferido de esta invención, se
30 prefieren partículas superiores a unas 100 micras (ya que

1 la columna tiende a obturarse si se emplean partículas más
pequeñas). En procedimientos en lecho de poco espesor (por
ejemplo isomerización en un reactor de filtro prensa) pue-
de emplearse cualquier tamaño de partícula. Sin embargo,
5 puesto que la actividad unitaria de la preparación de enzi-
ma puede ser en parte función del tamaño de partícula, el
tamaño de partícula usado para el proceso de isomerización
puede ser un factor a considerar en la eficacia de un pro-
cedimiento (o instalación) particular. En cualquier caso,
10 las preparaciones de enzimas descritas en la Solicitud de
Patente española Nº 440.521 presentada el 27 de Agosto de
1975, y en la Patente Belga Nº 832.852 correspondiente, pue-
den ser preparadas en tamaños de partícula deseados.

Para una comprensión adicional de la práctica de
15 esta invención, se hace referencia a los ejemplos específi-
cos siguientes, en los que la actividad de la enzima inmo-
vilizada se mide en unidades IGIC (Immobilized Glucose
Isomerase Column process). 1 unidad IGIC se define como la
cantidad de enzima que convierte glucosa en fructosa con
20 una velocidad inicial de $1 \mu\text{mol}/\text{minuto}$, bajo condiciones
normalizadas que son 40% p/p de glucosa, un pH 8,5 en la en-
trada, 65°C y $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ de Mg^{++} , sin Ca^{++} ; en una columna
con un lecho de relleno continuo; tamaño de columna 2,5 cm
x 40 cm.

25 En los ejemplos la productividad de la enzima en
un tiempo dado (horas) se define como la cantidad de gluco-
sa en kg que puede ser convertida en una mezcla de fructosa
y glucosa con un grado de conversión de 0,45 por kg de enzi-
ma de actividad inicial 100 IGIC/g.

30 Las preparaciones de enzima empleadas tenían una

1 actividad comprendida entre 150 y 250 IGIC por g. Con objeto de comparar resultados de preparaciones con diferente actividad, todos los valores de productividad fueron recalculados haciendo referencia a una actividad enzimática de
5 100 IGIC/g.

En los ejemplos el tiempo de contacto se refiere a una preparación con una actividad de 100 IGIC/g. Por ejemplo, un tiempo de contacto de 1 hora con una preparación de enzima de una actividad de 200 IGIC/g corresponde
10 a un tiempo de contacto de 2 horas con una preparación tipo de una actividad de 100 IGIC/g.

EJEMPLO 1

Isomerización en presencia y ausencia de Co.

Todas las isomerizaciones fueron llevadas a cabo
15 como reacciones continuas con flujo obturado en un lecho de relleno. La enzima de B.coagulans fué preparada según el Ejemplo 2 de la solicitud de patente española Nº 440.521. El tamaño de partícula varió entre 150 μ y 2800 μ . Esta preparación de enzima se humedeció previamente en jarabe de
20 glucosa de 40% en peso a temperatura ambiente durante 1 hora. Esta glucosa-isomerasa previamente humedecida, se colocó en diferentes columnas provistas de camisa de agua. Una corriente de jarabe de glucosa que tenía la concentración, el pH y otros datos característicos de la misma según la tabla que figura a continuación, se envió en sentido
25 ascendente a través del material enzimático. El caudal se ajustó para dar una conversión del jarabe de salida de 45%. El caudal lineal siempre excedía de 10 cm/hora (límite de difusión de película). La concentración de Ca^{++} en
30 este ejemplo era inferior a $2,5 \times 10^{-5}M$.

TABLA 1A

Operación	Temp. °C	Conc. de glucosa p/p	pH de la alimentación	Co ⁺⁺ añadido, M	Mg ⁺⁺ añadido, M
I	60	40%	8,5	0	8 x 10 ⁻³
II	60	40%	8,5	3,5x10 ⁻⁴	8 x 10 ⁻³
III	65	40%	8,5	0	8 x 10 ⁻³
IV	65	40%	8,5	3,5x10 ⁻⁴	8 x 10 ⁻³
V	65	40%	7,6	0	8 x 10 ⁻³
VI	65	40%	7,6	3,5x10 ⁻⁴	8 x 10 ⁻³

Se utilizaron tamaños de columnas diferentes, es decir, columnas de tamaños (1,5 cm x 35 cm) y (5,8 cm x 45 cm), en donde la primera dimensión se refiere al diámetro y la segunda a la altura de la columna. Con el propósito de brevedad las columnas se denominan más adelante las columnas de 60 ml y 1 l respectivamente. Se introdujeron 9 g de enzima en la columna de 60 ml y 225 g de enzima en la columna de 1 l.

Todas las isomerizaciones fueron continuadas durante 450 horas. Después de esto se midió la actividad residual y se calcularon la productividad por 100 IGIC/g y el tiempo de contacto por 100 IGIC/g. Los resultados se indican en la tabla siguiente:

TABLA 1B

Columna	Características	I	II	III	IV	V	VI
	Productividad por 100 IGIC/g	340	315	420	375	395	410

TABLA 1B (Cont.)

Columna	Características	I	II	III	IV	V	VI
60 ml	Actividad residual	65%	60%	52%	42%	28%	41%
5	Tiempo de contacto por 100 IGIC/g, min.	90-140	90-150	75-145	75-180	75-270	75-185
10	Productividad por 100 IGIC/g	350	320	440	370	400	415
1 l	Actividad residual.	69%	59%	60%	45%	44%	46%
15	Tiempo de contacto por 100 IGIC/g, min.	90-130	90-155	75-125	75-170	75-170	75-170

20 En la tabla anterior (y en las tablas semejantes que figuran a continuación) en las que se da más de un valor para el tiempo de contacto, la primera cifra corresponde al comienzo de la operación con alta actividad, y la última cifra corresponde al término de la operación, con una actividad algo más baja.

25 Pueden extraerse las siguientes conclusiones de la tabla anterior:

- 1) La productividad por 100 IGIC/g de la actividad residual es mejor sin Co que con Co, cuando el pH se mantiene en el nivel recomendado.
 - 2) Cuando el pH está por debajo del nivel recomendado, la productividad por 100 IGIC/g y la actividad re-
- 30

1 sidual son mejores con Co que sin Co, pero los valores con Co son más pequeños que los valores obtenidos sin Co y con un pH dentro del nivel recomendado.

EJEMPLO 2

Isomerización en presencia y ausencia de Mg

5 Las isomerizaciones fueron efectuadas según se ha descrito en el Ejemplo.

1. Los parámetros siguientes se mantuvieron constantes durante la serie de experimentos:

10	Conc. de glucosa	40% p/p
	pH, a la entrada	8,5
	adición de Co^{++}	Ninguna
	Conc. de Ca^{++}	Menos de $2,5 \times 10^{-5} M$
	Temperatura	65°C.

15 La adición de magnesio: varió entre $0 - 8 \times 10^{-3} M$

Después de 450 horas de isomerización se interrumpieron los experimentos. Se determinó la actividad residual, y se calcularon la productividad por 100 IGIC/g y el tiempo de contacto por 100 IGIC/g. Los resultados se indican en la tabla siguiente:

TABLA 2

Columna	Características	Adición de Mg^{++}, M				
		0	4×10^{-4}	8×10^{-4}	4×10^{-3}	8×10^{-3}
25	Productividad por 100 IGIC/g	400	419	424	415	420
60 ml	Actividad residual	50%	50%	50%	48%	52%

TABLA 2 (Cont.)

Columna	Características	Adición de Mg^{++} , M				
		0	4×10^{-4}	8×10^{-4}	4×10^{-3}	8×10^{-3}
5	Tiempo de contacto, min. por IGIC/g	75-150	75-150	75-150	75-155	75-145
10	Productividad por 100 IGIC/g	410	435	435	450	440
11	Actividad residual	58%	60%	62%	62%	60%
15	Tiempo de contacto, min. por 100 IGIC/g	75-130	75-125	75-125	72-125	78-125

Se aprecia de la tabla que la adición de Mg^{++} no afecta a la productividad por 100 IGIC/g o a la actividad residual.

EJEMPLO 3

Isomerización con proporciones variables entre Mg^{++} y Ca^{++} .

Las isomerizaciones fueron efectuadas según la descripción dada en el Ejemplo 1. Se usaron cinco columnas de 60 ml simultáneamente, una con adición constante de Mg^{++} al jarabe alimentado y sin Ca^{++} , y la otra con proporciones variables entre Mg^{++} y Ca^{++} en el jarabe de glucosa.

Se usaron los siguientes parámetros:

glucosa, 40% (p/p) (40% p/p)

1	pH a la entrada, 8,4	(8,4)
	65°C	(65°C)
	0 M de Co^{++}	(0 M de Co)
	Mg^{++} variable	(4 x 10 ⁻³ M de Mg^{++})
5	Ca^{++} variable	menos de 2,5 x 10 ⁻⁵ M

La actividad en la columna testigo (sin Ca) se midió usando los valores de los parámetros indicados entre paréntesis. Después de 800 horas de operación la enzima de la columna testigo había disminuido al 25% de su actividad inicial. Las cifras de la siguiente tabla son las actividades en tanto por ciento relativas a la actividad enzimática de la columna testigo después de hacerse funcionar el mismo número de horas:

TABLA 3

15	Horas	$\frac{\text{Mg}}{\text{Ca}} = 1,4$	Horas	$\frac{\text{Mg}}{\text{Ca}} = 2,8$	Horas	$\frac{\text{Mg}}{\text{Ca}} = 4,2$	Horas	$\frac{\text{Mg}}{\text{Ca}} = 8,4$
	1	100	1	100	1	100	1	100
	20	94	20	96	20	99	20	100
	45	56	40	96	60	96	100	100
	70	60	60	94	120	89	200	89
	100	52	90	86	180	84	240	92
	120	52	120	79	240	81	300	83
			135	80			420	78
20	t 1/2 ≈ 100 hrs.		t 1/2 ≈ 300 hrs.		t 1/2 ≈ 800 hrs.		t 1/2 > 1000 hrs.	

Los resultados tabulados anteriores demuestran que la relación $\text{Mg}^{++}/\text{Ca}^{++}$ es significativa para la vida de la enzima; la relación debe exceder de 5 y preferiblemente de 10.

25 EJEMPLO 4

Dependencia de la isomerización de la concentración de glucosa existente en el jarabe de alimentación

30 Las isomerizaciones fueron efectuadas en el Ejemplo 1.

Se usaron los siguientes parámetros:

Concentración de glucosa	variable entre 40-50% p/p
pH en la entrada	8,4
temperatura	65°C
Co	Nada
Mg	0,004 M
Ca	menos de $2,5 \times 10^{-5}M$

En la tabla que figura a continuación la productividad, la actividad residual y el tiempo de contacto se indican para 450 horas de ejecución en columnas de 60 ml.

TABLA 4

<u>Glucosa, % (p/p)</u>	<u>40%</u>	<u>45%</u>	<u>50%</u>
Productividad/100 IGIC/g	430	410	380
Actividad residual	48%	50%	50%
Tiempo de contacto, min./100 IGIC/g	75-150	85-170	95-190

EJEMPLO 5

Influencia del pH sobre la actividad.

La influencia del pH sobre la actividad de la glucosa-isomerasa inmovilizada preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2, en la Solicitud de Patente española Nº 440.521, véase también el Ejemplo 2 en la correspondiente Patente Belga Nº 832.852, se determinó en una columna de flujo obturado continuo, con las dimensiones de 2,5 cm x 35 cm. La isomerización fue efectuada según se ha descrito en el Ejemplo 1. Cada medida de actividad se efectuó del siguiente modo. Se dejaron cinco horas para que la columna alcanzase el equilibrio antes de medir la actividad. Después se cambió el pH de la carga al siguiente valor, y entonces se hizo funcionar la columna otras 5 horas, y así sucesiva-

1 mente. Se usaron los parámetros siguientes:

	Concentración de glucosa	40%
	pH	variable entre 5,0 - 9,5
	Temperatura	65°C
5	Co	Nada
	Mg	0,004 M
	Ca	Menos de $2,5 \times 10^{-5}$ M
	Tiempo de contacto	50 minutos.

10 Las actividades en tanto por ciento relativo, pueden apreciarse en la siguiente tabla, definiéndose la actividad máxima como 100 a un pH de 8,5:

TABLA 5

pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
% de actividad	5	15	45	60	70	85	95	100	95	90

15 EJEMPLO 6

Dependencia de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad.

20 Las isomerizaciones fueron llevadas a cabo según se ha descrito en el Ejemplo 1 con glucosa-isomerasa producida según se ha descrito en el Ejemplo 2 de la Solicitud de Patente española Nº 440.521 (véase también el Ejemplo 2 de la Patente Belga Nº 832.852 correspondiente). Se hicieron funcionar isotérmicamente siete columnas a diferentes

25 temperaturas comprendidas entre 60-90°C. Se midió la actividad inicial así como también la vida media (el tiempo necesario para reducir la actividad al 50% de la actividad inicial).

Se usaron los parámetros siguientes:

30	Conc. de glucosa	40% p/p.
----	------------------	----------

1	pH	8,5
	temperatura	variable
	Co	nada
	Mg	0,004 M
5	Ca	menos de $2,5 \times 10^{-5}$ M.

Se obtuvieron los resultados siguientes:

Temp.	% de actividad	Estabilidad (Vida media)	Tiempo de contacto (min.) por 100 IGIC/g
60°C.	25%	600 horas	90-180
65	30%	450 horas	75-150
70	40%	250 horas	55-110
10 75	55%	125 horas	40-80
80	70%	60 horas	30-60
85	90%	10 horas	25-50
90	100%	2 horas	23-45

EJEMPLO 7

Influencia del tamaño de partícula sobre la actividad

15 Excepto por las preparaciones de enzima, las isomerizaciones fueron llevadas a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1. En este ejemplo se usaron dos preparaciones de enzima, es decir, las preparaciones de glucosa-isomerasa
20 inmovilizada descritas en los Ejemplos 2 y 3, última alternativa en la solicitud de Patente española Nº 440.521, designadas X e Y respectivamente, (véanse también los Ejemplos correspondientes en la Patente Belga correspondiente Nº 832.852).

25 Antes de introducir en las columnas las preparaciones de enzima fueron clasificadas ambas.

Se usaron los parámetros siguientes:

30	Concentración de glucosa	40% p/p
	pH	8,0
	temperatura	65°C

1	Co	Nada
	Mg	0,004 M
	Ca	Menos de $2,5 \times 10^{-5}$ M

El efecto del tamaño de partícula sobre la actividad de las preparaciones X e Y se pone de manifiesto en la tabla siguiente:

TABLA 7

<u>Preparaciones de glucosa-isomerasa X.</u>		
<u>Distribución del tamaño de partícula</u>		<u>% de actividad</u>
10	150-297 μ	100%
	297-500 μ	98%
	500-1000 μ	97%
	1000-1410 μ	94%
	1410-2000 μ	84%
	2000-2800 μ	80%

<u>Preparaciones de glucosa-isomerasa Y.</u>		
<u>Distribución del tamaño de partícula</u>		<u>% de actividad</u>
15	75-250 μ	100%
	250-354 μ	69%
	354-500 μ	48%
	500-707 μ	39%
	707-1000 μ	34%

Se encontró que la estabilidad no dependía apreciablemente del tamaño de partícula. Como se desprende de las cifras anteriores, la actividad de algunas preparaciones depende más del tamaño de partícula que otras. No está totalmente entendida la causa de que la actividad de las preparaciones X varíe mucho menos con el tamaño de partícula que la actividad de las preparaciones Y. Sin embargo, se cree que este fenómeno está relacionado con la forma de la partícula. Se ha encontrado que la preparación X está constituida principalmente por planchas, mientras que la preparación Y está constituida principalmente por esferas. La longitud media de poro en las planchas para un tamaño de partícula dado es considerablemente más pequeña que la longi

1 tud media del poro en las esferas, para el mismo tamaño de partícula, y esto podría explicar que la actividad, en general, es menor para la preparación Y que para la preparación X.

5 EJEMPLO 8

Formación de color

Las isomerizaciones fueron efectuadas como en el Ejemplo 1. Se llenaron seis columnas con cantidades variables de enzima para mantener constante el grado de conversión y el tiempo de contacto en 45% y 1 hora respectivamente. Se usaron los parámetros siguientes:

Concentración de glucosa	45% p/p
pH	8,5
Temperatura	variable
Co ⁺⁺⁺	Nada
Mg ⁺⁺	8 x 10 ⁻⁴ M
Ca ⁺⁺	Menos de 2,5 x 10 ⁻⁵ M

Se encontraron aumentos del índice de color Icumsa, como se indica seguidamente, aproximadamente después de 100 horas de isomerización:

TABLA 8

<u>Temperatura</u>	<u>Índice de color Icumsa</u>
60°C.	24
65°C.	25
70°C.	26
75°C.	30
80°C.	39
85°C.	65

$$\text{Color Icumsa} = 10^3 \times \frac{a}{b \times c}$$

en la que a es DO₄₂₀ (densidad óptica)

b es S.S en g/ml (sustancia seca)

c es la longitud de la cubeta en que se mide, en centímetros.

1 EJEMPLO 9

Influencia del tamaño de la columna
(escalonamiento ascendente)

5 Excepto por la preparación de enzima, la isomeri-
zación fue efectuada como en el Ejemplo 1. La enzima fue
producida según el Ejemplo III, última alternativa, en la
Solicitud de Patente española Nº 440.521, (véase también el
Ejemplo correspondiente en la Patente Belga Nº 832.852 co-
rrespondiente. El tamaño de partícula estaba comprendido en-
10 tre 150 y 500 μ . Los parámetros usados se indican en la ta-
bla siguiente.

TABLA 9

Tamaño de la columna	60 ml	1 l	50 l
Nº de columnas	1	1	1
15 Dimensiones, altura en cm x diámetro en cm	35 x 1,5	45 x 5,8	188 x 20
Gramos de enzima usados	20	470	23000
Temperatura isotérmica	65°C	65°C	65°C
20 Concentración de glucosa	40%	40%	40%
pH de la	8,5	8,5	8,5
Concentración de Mg, en moles	0,0008	0,0008	8×10^{-4}
Co	Nada	Nada	Nada
25 Ca ⁺⁺	menos de $2,5 \times 10^{-5}M$	menos de $2,5 \times 10^{-5}M$	menos de $2,5 \times 10^{-5}M$
Horas de isomerización en total	450	450	450

Se obtuvieron los resultados siguientes:

Tamaño de la columna	60 ml	1 l	50 l
30 Productividad/100 IGIC/g	440	420	455

1	Actividad residual	50%	53%	60%
	Tiempo de contacto/100 IGIC/g (min.)	75-150	75-150	75-140

5 Se pone de manifiesto de las cifras anteriores que el escalonamiento ascendente del proceso de isomerización desde la columna de 60 ml, puede ser efectuado sin dificultad alguna y esencialmente con los mismos valores de la productividad y de las actividades residuales.

10

REIVINDICACIONES

15

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención, en España, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Un procedimiento continuo para isomerizar jarabe de glucosa a una mezcla de glucosa y fructosa, que comprende hacer pasar un jarabe de 30-55% en peso de glucosa que contiene no más de 10^{-3} M de Ca^{++} y 10^{-2} M de Mg^{++} y en donde la relación molar $\text{Mg}^{++}:\text{Ca}^{++}$ está comprendida entre 5 y 500 para Mg^{++} , 10^{-3} M y superior a 5 para $\text{Mg}^{++} \leq 10^{-3}$ M, a través de un lecho de partículas de glucosa-isomerasa inmovilizada con glutaraldehído, de tamaño superior a aproximadamente 100 micras, procedente de B.coagulans a un pH a la entrada comprendido entre 7,8 - 8,6,

25 a temperaturas comprendidas entre 60-85°C, durante un tiempo

30

1 po de contacto total de menos de 3,5 horas, e isomerizar
con ello el jarabe, hasta por lo menos 40% de fructosa del
peso del contenido de glucosa y fructosa.

5 2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
en donde se encuentra ausente del jarabe de glucosa Co^{++}
añadido.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
en el que el Ca^{++} es menor de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ M,
y el Mg^{++} es menor de aproximadamente 5×10^{-4} M, siendo el
10 contenido de Mg^{++} por lo menos 10 veces el contenido de
 Ca^{++} .

4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª,
en el que la enzima glucosa-isomerasa en partículas se dis-
pone en una columna.

15 5ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
en el que el tiempo de contacto es inferior a aproxima-
damente dos horas.

6ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
que comprende efectuar el proceso con un jarabe que contie-
20 ne de 40 a 45% en peso de glucosa.

7ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
que comprende efectuar el proceso a una temperatura compren-
dida entre 60 y 70°C.

8ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
25 en el que el B.coagulans es una cepa atípica de B.coagulans,
caracterizada por la aptitud de desarrollarse solamente so-
bre nitrógeno inorgánico como medio nutritivo nitrogenado.

9ª.- "UN PROCEDIMIENTO CONTINUO PARA ISOMERIZAR
JARABE DE GLUCOSA A UNA MEZCLA DE GLUCOSA Y FRUCTOSA"

30 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-

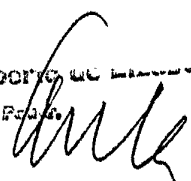
1 cede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 31 MAR. 1976

P.A.

Alberto de Linares
Per Fca. M.



5
10
15
20
25
30