



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO 449.466	(10) A 1
	(21) FECHA DE PRESENTACION 1-7-1976	

PATENTE DE INVENCION

P.- 63.512

Case D-3068 72 01

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
S48-102747	13-9-73	Japón
S48-102748	13-9-73	"
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	429.986
(64) TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN COMPUESTO DE ISOMERASA DE DEXTROSA INMOVILIZADA"		
(71) SOLICITANTE (S)		
CPC INTERNATIONAL INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
International Plaza, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, E.U.A.		
(72) INVENTOR (ES)		
Shiro Hasegawa, Masaki Tamura, Soichiro Ushiro y Masako Watanabe		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

La presente invención se relaciona con un método para preparar isomerasa de dextrosa inmovilizada, como así también un método para isomerizar dextrosa. La isomerasa de dextrosa inmovilizada es susceptible de llevarse a cabo en columna, lo cual resulta eficaz y conveniente para la isomerización en escala industrial.

Isomerasa de dextrosa es el nombre general de enzimas que convierten dextrosa a levulosa y viceversa. Por lo tanto, se puede usar principalmente la isomerasa de dextrosa con la finalidad de preparar levulosa a partir de dextrosa.

Sin embargo en la actualidad, la enzima se utiliza en el Japón en la isomerización de dextrosa a jarabe que contiene levulosa, en escala industrial. Se lleva a cabo esta reacción manteniendo una solución de dextrosa en contacto con la enzima a temperaturas comprendidas entre 60 y 70°C durante aproximadamente 48 hr. Sin embargo, el llevarla a cabo mediante un sistema por tandas, adolece de la desventaja de que es reducido el rendimiento de utilización de la enzima. Otra desventaja es que el producto requiere un costoso procedimiento de refinación, debido a que se colorea durante la reacción, llevada a cabo a altas temperaturas durante un tiempo prolongado. Creyendo que este problema podía resolverse inmovilizando isomerasa de dextrosa, se llevaron a cabo, de acuerdo con

la presente invención, una serie de estudios referentes a la preparación de isomerasa de dextrosa inmovilizada.

En los últimos años, han sido desarrollados diversos métodos para inmovilizar enzimas. En términos generales, se puede dividir estos métodos en los siguientes grupos: (1) se combina proteína de enzima con vehículos insolubles en agua, química o eléctricamente a través de adsorción o un enlace covalente. (2) Se forma ligaduras cruzadas en la proteína de enzima con un compuesto que tiene más de dos grupos funcionales. (3) Se confina proteína de enzima en un reticulado de gel o en una membrana semipermeable. (4) Se fija enzimas intracelulares dentro de células por tratamiento físico o químico.

En lo que se refiere a la inmovilización de isomerasa de dextrosa, el método de adsorber la enzima sobre DEAE-celulosa, patente norteamericana Nº 3.708.397, o DEAE-sephadex, Tsumura, N. e Ishikawa M., Journal of Food Science and Technology, Vol. 14, Nº 12.539 (1967), y el de combinarla covalentemente con vidrio aminoalquílico (método diazoico), Strandberg, G.W. y Smiley, K.L. Biotech. and Bioeng., Vol XIV, 509 (1972), pertenecen al grupo (1). El método de formar ligaduras cruzadas en la enzima con glutaraldehido pertenece al grupo (2). El método de confinar la enzima en el gel de poliacrilamida, Strandberg, G.W. y Smiley, K.L. Appl. Microbial., 21, 588

(1971), pertenece al grupo (3), y el de fijar la enzima dentro de células, tratando las células con glutaraldehído (solicitud de patente pendiente japonesa S47-45546), pertenece al grupo (4).

5 Sin embargo, la isomerasa de glucosa inmovilizada, preparada mediante los métodos de los grupos (2), (3) y (4), manifiesta pobres propiedades hidráulicas cuando se la compacta en columnas grandes. Por lo tanto, resulta difícil mantener un caudal constante durante un tiempo
10 prolongado. Por otra parte, la DEAE-celulosa y el vidrio aminoalquílico son costosos para el uso en la puesta en práctica de la isomerización continua de dextrosa a escala industrial.

Habiéndose comprobado que las resinas de permutación
15 iónica son menos costosas y son susceptibles de operación en columna, se investigó, de acuerdo con la presente invención, el método de inmovilizar isomerasa de dextrosa en las mismas. El método de adsorber enzimas sobre resinas de permutación iónica, pertenece al grupo (1). Anteriormente se había intentado adsorber glucoamilasa sobre
20 Amberlite CG-50, Miyamoto, K. Fujii, T. y Miura, Y. J. Ferment. Tech. 49 No 6, 565 (1971), o inmovilizar aminoacilasa con Amberlite IR-45 ó Diaion SA-11A, Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. y Chibata, I: Enzymología, 31, 214 (1966).

25 Sin embargo, estos métodos no fueron aún puestos en

práctica a escala industrial, debido a que las resinas de permutación iónica utilizadas son de baja adsorción de enzimas por cantidad unitaria en comparación con celulosa de permutación iónica (tal como
5 CM-celulosa y DEAE-celulosa). En las investigaciones realizadas con motivo de la presente invención, se aplicó la mencionada Amberlite CG-50, IR-45 ó Diaion SA-11A a isomerasa de dextrosa, pero su adsorción de las enzimas resultó muy bajo, según se explicará más adelante.

10

DEFINICIONES

Debido a la considerable cantidad de términos que se encuentran en uso común en esta técnica, se dará algunas definiciones para aclarar lo que se describe en
15 esta solicitud.

D. E.

El término "D.E" es una abreviatura de "equivalente de dextrosa", y se utiliza estas expresiones intercambiabilmente para referirse al contenido de azúcar
20 reductor de un material calculado como dextrosa y expresado como porcentaje de sólidos en total.

HIDROLIZADO DE ALMIDON

25

La expresión "hidrolizado de almidón" se utiliza

para referirse a un jarabe o un producto seco que se produce por hidrólisis de almidón. Se puede producir un producto de esta clase mediante hidrólisis ácida o enzimática. Un tipo preferido de hidrolizado de almidón para el uso en la isomerización de acuerdo con la presente invención, se produce mediante dilución ácida o por enzima hasta un D.E. de 10 o menos, seguido por sacarificación enzimática hasta un D.E. de aproximadamente 95 y de preferencia superior a 97,5.

10

GLUCOSA Y DEXTROSA

A los hidrolizados de almidón de D.E. medio se los denomina comúnmente en esta técnica "glucosa", tanto cuando el hidrolizado de almidón afecta la forma de un jarabe como cuando afecta la forma de sólidos. Comúnmente se reserva el término "dextrosa" para el monosacárido cristalino refinado que es recuperado a partir de un hidrolizado de almidón de elevado D.E., o para D-glucosa como un constituyente de los hidrolizados de almidón. Tal como se le utiliza aquí, el término "dextrosa" abarca este monosacárido en cualquier forma, en solución o seco, como un constituyente de un jarabe de hidrolizado de almidón, sólidos de jarabe, o en forma cristalina refinada.

FRUCTOSA Y LEVULOSA

5 En la técnica se utiliza en general intercambia-
blemente los términos "fructosa" y "levulosa", para
referirse al isómero de dextrosa que es más dulce que
la dextrosa. Se encuentra este isómero en la miel y en
el azúcar invertido, juntamente con dextrosa, y es va-
lioso debido a su dulzura. Se utiliza aquí el término
"levulosa" para referirse a este monosacárido.

ISOMERASA DE DEXTROSA

10 La enzima que isomeriza la dextrosa a levulosa ha
recibido en la técnica varios nombres. En la patente
norteamericana Nº 2.950.228 de Marshall se hace refe-
rencia a la misma como isomerasa de xilosa debido a que
15 isomeriza xilosa a xilulosa. Esta actividad es adicional
a su capacidad para isomerizar dextrosa a levulosa.
También se la ha denominado en la técnica isomerasa de
dextrosa e isomerasa de glucosa. Se han utilizado aquí
los términos "isomerasa de dextrosa" o, más brevemente,
20 "isomerasa".

RESUMEN DE LA INVENCION

25 De acuerdo con la presente invención, se ha exa-
minado diversas resinas comerciales con respecto a su
capacidad para adsorber isomerasa de dextrosa. Como re-
sultado, se ha comprobado que las resinas de permutación

aniónica fuertemente básicas, del tipo macrorreticular o poroso, y las resinas de permutación aniónica débilmente básicas del tipo macrorreticular o poroso, son especialmente excelentes por su capacidad de adsorción.

5 Además, la isomerasa de dextrosa inmovilizada sobre las mismas es de baja elución y permanece estable durante la reacción de isomerización continua cuando se ajusta la solución de substrato a valores de pH de aproximadamente 7,0 a 8,5.

10 Como resultado, se ha comprobado también que, en el caso de la isomerización de dextrosa a levulosa por circulación continua de una solución que contiene dextrosa, cuyo pH ha sido previamente ajustado de preferencia

15 aproximadamente a 8,0, a través de la columna compactada con isomerasa inmovilizada que ha sido preparada por contacto de una solución de isomerasa de dextrosa con resinas de permutación aniónica fuertemente básicas del tipo macrorreticular o poroso y adsorbiendo

20 la enzima sobre la misma, cuando la actividad de la enzima inmovilizada disminuye y por consiguiente disminuye también el régimen de isomerización, resulta posible reactivar la enzima mediante el agregado de isomerasa a la alimentación de solución que contiene

25 dextrosa, sin suspender la reacción de isomerización, y se puede llevar a cabo la isomerización continua sin

interrupción.

La presente invención es un método de isomerización continua que se caracteriza por la repetición del procedimiento de resuministro de enzima, de acuerdo con lo necesario para una operación continua a un nivel deseado de rendimiento e isomerización, en un determinado reactor bajo un juego deseado de condiciones de isomerización. En el curso de la isomerización continua de dextrosa a levulosa, haciendo pasar una solución de dextrosa, de preferencia ajustada a un valor de pH que se encuentra en las proximidades de 8,0, a través de una columna compactada con isomerasa de dextrosa inmovilizada que ha sido preparada adsorbiendo la isomerasa sobre resinas de permutación aniónica del tipo macrorreticular o poroso, agregándose nueva isomerasa de dextrosa a la solución que contiene dextrosa que se debe hacer pasar a través de la columna cuando la actividad de la enzima inmovilizada ha disminuido en un cierto grado. Con la enzima inmovilizada reactivada en esta manera, se hace pasar entonces a través de la columna la solución de alimentación que contiene dextrosa (sin isomerasa).

DESCRIPCION GENERAL DE LA INVENCION

LA ENZIMA

Se puede emplear el procedimiento de la presente

invención, dentro de lo que se sabe, para la producción de preparaciones de enzima inmovilizada a partir de todos los tipos de isomerasa de dextrosa, incluyendo aquellas en que la enzima tiene una acción catalítica dominante o más rápida sobre una isomerización distinta que la dextrosa a levulosa. Se puede derivar la enzima de isomerasa a partir de una gran cantidad de diferentes fuentes microbianas.

La isomerasa de dextrosa que es útil en la presente invención puede originarse, por ejemplo en las células de hongos radiados (por ejemplo Streptomyces albus) o bacterias (por ejemplo Lactobacillus brevis), que se conocen como microorganismos productores de isomerasa de dextrosa. Se la utiliza en las diferentes formas de isomerasa cruda extractada de células de los microorganismos productos por autólisis o por tratamiento supersónico, y separada entonces con respecto a los desechos de células, o como isomerasa parcialmente purificada que se obtiene separando ácido nucléico que está presente en la isomerasa cruda mediante protamina, o como isomerasa cristalina que se obtiene por cristalización de isomerasa parcialmente purificada que ha sido adicionalmente purificada por fraccionamiento con sulfato de amonio.

Cada enzima parece tener sus propias caracterís-

5 ticas particulares, como por ejemplo pH óptimo, temperatura óptima, los iones de metal necesarios, la constante de Michaelis, y el mecanismo de formación de levulosa, todo lo cual resulta ser un poco diferente entre una enzima y otra. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención resulta útil con preparaciones de enzima de isomerasa inmovilizada obtenida a partir de todas las fuentes microbianas útiles, y más específicamente a partir de todas las especies y copas de Stbeptomyces y todas las especies y cepas de Bacillus que producen preparaciones de enzima de isomerasa de dextrosa.

15 Los microorganismos preferidos, para producir isomerasa apropiada para el uso en la puesta en práctica de la presente invención, son los miembros del género Streptomyces. Especies particularmente preferidas, de este género, son S. Venezuelae y S. olivochromogenes. Cultivos de cepas preferidas de estos organismos han sido depositados en American Type Culture Collection, Washington, D.C., y agregados a su colección permanente de microorganismos. Se les ha asignado la siguiente identificación S. venezuelae ATCC 21.113 y S. olivochromogenes ATCC 21.114.

25 Los microorganismos preferidos son cepas mutantes de Streptomyces olivochromogenes, especialmente S.

olivochromogenes ATCC Nº 21.713, 21.714, 21.715 y sus equivalentes. Estos microorganismos forman cantidades apreciables de isomerasa cuando se los cultiva en medios nutritivos libres de xilosa y de material que suministra xilosa, y libres de cobalto agregado.

Una unidad de actividad de enzima se define como la cantidad de actividad de enzima que forma 1 micromol de levulosa en 1 min bajo las condiciones de isomerización que se describirán más adelante. Para preparar una enzima para ensayo, es primeramente necesario convertirla a una forma soluble. Un medio apropiado para llevar esto a cabo es por sonificación.

Las células de un volumen conocido de caldo de cultivo son resuspendidas en regulador fosfato 0,05 molar (pH 7,5). Se sonifica entonces la suspensión utilizando un sonificador Branson Modelo 185-1) (20 kHz) hasta que las células microbianas de la misma han sido suficientemente desgarradas, de modo que ha quedado liberada substancialmente la totalidad de la enzima de isomerasa. Manteniendo el tubo de la muestra en un baño de hielo durante la sonificación, se impide el recalentamiento y la inactivación de la enzima. La preparación de enzima resultante es una solución de isomerasa solubilizada.

El procedimiento de ensayo involucra llevar a cabo una determinación espectrofotométrica de la cetosa produ-

cida a partir de una solución de dextrosa bajo un juego normalizado de condiciones. En la siguiente manera se produce una solución de existencia.

5 TABLA 1 - Solución de Existencia para Ensayo

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
MSO·7H ₂ O 0,1 M	ml 1
CoCl ₂ ·6H ₂ O 0,01 M	ml 1
Regulador fosfato 1 M, pH 7,5	ml 0,5
10 D-glucosa anhidra	g 1,44
Agua destilada hasta un volumen total de	ml 7,5

15 Primeramente se diluye la preparación de enzima que se debe ensayar, de modo que contenga 1 a 6 unidades de isomerasa por mililitro.

20 Se lleva a cabo una isomerización enzimática agregando 1 ml de la preparación de enzima a 3 ml de la solución de existencia, e incubando durante 30 min a 60°C. Al término del periodo de incubación, se toma una alícuota de 1 ml y se la enfría bruscamente en un volumen de 9 ml de ácido perclórico 0,5 N. Se diluye entonces la alícuota, así enfriada, hasta un volumen total de 250 ml. Como testigo para fines comparativos, se produce también
25 1 ml de la preparación de enzima en forma de solución

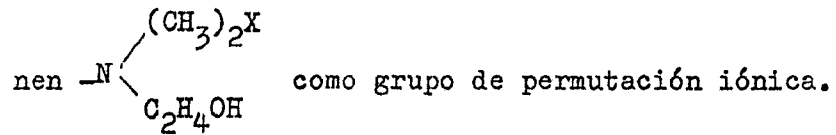
por 1 ml de agua, al comienzo del periodo de incubación.

5 Se determina entonces la cetosa mediante un método con cisteína y ácido sulfúrico. Para la finalidad de este ensayo, se define 1 unidad de isomerasa como la cantidad de actividad de enzima que se requiere para producir 1 micromol de levulosa por minuto bajo las condiciones de isomerización descritas.

LOS PORTADORES DE RESINA

10 A continuación se describirá las resinas de permutación aniónica fuertemente básicas del tipo macrorreticular o poroso y las resinas de permutación aniónica débilmente básicas del tipo macrorreticular o poroso, utilizadas en la presente invención.

15 Bajo la expresión resinas de permutación iónica del tipo poroso debe entenderse aquí las resinas de permutación iónica que tienen numerosos poros. Estas resinas de permutación iónica son en general aptas para adsorción. A las resinas de permutación iónica del tipo macrorreticular se las designa comúnmente como del tipo MR, y tienen poros relativamente grandes. Bajo la expresión resinas
20 de permutación aniónica fuertemente básicas debe entenderse aquí las resinas que tienen $-N-(CH_2)_3X$ como grupo de permutación iónica y se las distingue de las que tie-



5 Amberlite IRA-904 y IRA-938 (Rohm & Haas Co., U.S.A.) se encuentran comercialmente disponibles como resinas de permutación aniónica fuertemente básicas del tipo MR, y Diaion PA-308 y PA 304 (Mitsubishi Chemical Co., Japón) como resinas de permutación iónica fuertemente básicas del tipo poroso. Amberlite IRA-93

 10 (Rohm & Haas Co., U.S.A.) se encuentra comercialmente disponible como resina de permutación aniónica débilmente básica del tipo MR y Diaion WA-30 (Mitsubishi Chemical Co., Japón) como resina de permutación aniónica débilmente básica del tipo poroso.

15 Más convenientemente se utiliza las partículas de resina o polímero bajo la forma de gránulos o perlas y están además comprendidas en general en la gama de 16 a 100 mallas de tamaño de partícula (Serie de Tamices Normalizados U.S.) y más preferiblemente bajo la forma

 20 de perlas de 20 a 50 mallas. Por razones de conveniencia de uso se coloca o dispone las perlas en una columna.

25 Las resinas macrorreticulares se caracterizan por la presencia, a través de la matriz polímera, de una red de microcanales o poros "extra-gelulares". Aunque

5 estos microcanales son muy pequeños, son grandes en comparación con los poros en geles homogéneos convencionales que tienen ligaduras cruzadas. Las resinas macrorreticulares apropiadas para el uso en la presente invención, pueden tener áreas superficiales específicas de hasta 2.000 m²/g o más.

10 El área superficial y la porosidad (indicadas a menudo como ml/ml ó cm³/cm³), como así también otras características físicas de las resinas macrorreticulares, pueden medirse de acuerdo con procedimientos aceptados; por ejemplo, ver págs. 152-167 de "Oxidation-Reduction Polymers", Harold G. Cassidy y otros, Interscience Pub. N.Y., N.Y., 1965.

15 Para producir las áreas superficiales de alta porosidad y altamente específicas, que se requieren en las resinas de la presente invención, se puede utilizar los procedimientos de polimerización en suspensión que se describen en la patente británica 932.126, y cuya descripción se incorpora aquí a título de referencia.

20 PREPARACION DE LA ISOMERASA INMOVILIZADA

A continuación se explicará los métodos para obtener la adsorción de la isomerasa de dextrosa sobre estas resinas de permutación aniónica. Se emplea la isomerasa bajo la forma de soluciones: soluciones de regulador tris
25 -HCl o fosfato 0,01 - 0,1 M; soluciones salinas tales

como una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 ó KNO_3 , todas ajustadas a pH 6 - 9 (de preferencia pH 7-8); o simplemente en agua o en soluciones de dextrosa; teniendo todas concentraciones comprendidas entre 3 y 50 unidades/ml.

5

Se compacta la resina de permutación iónica en una columna del tamaño apropiado y se equilibra entonces haciendo pasar la misma solución, que la utilizada para disolver la isomerasa, a través de la columna a un caudal comprendido entre 1 y 3 VS durante 5 a 10 hr ("VS" es una abreviatura de velocidad del substrato, y se refiere al caudal en volúmenes del lecho por hora; un volumen de lecho es el volumen de substrato por hora que equivale al volumen de la columna que es retomado por la resina en la columna). Los grupos de permutación iónica tales como cloruro, sulfato, bisulfato, nitrato, carbonato, bicarbonato, borato o fosfato, proporcionan mejores resultados de adsorción de isomerasa de dextrosa que el tipo OH. Se hace pasar entonces una cantidad de la solución de isomerasa de dextrosa que corresponde a 10 a 100 unidades (de preferencia 50 unidades) de la enzima por gramo de resina (húmeda) a través de la columna de resina con un caudal comprendido entre 1 y 3 VS. Después de haber pasado la totalidad de la solución de enzima a través de la columna, se hace pasar agua

10

15

20

25

a través de la columna de modo de eliminar por lavado la isomerasa no adsorbida.

Luego se retira la resina de la columna y se la mide con respecto a su actividad de isomerasa.

5 Como resultado de una serie de experimentos, de acuerdo con la presente invención, se ha comprobado que las propiedades químicas enzimáticas, tales como pH óptimo y resistencia térmica de la isomerasa de dextrosa inmovilizada sobre una resina de permutación iónica, son casi similares a las de la isomerasa de dextrosa soluble original. Además, esta isomerasa inmovilizada no manifiesta disminución de la actividad enzimática durante 3 meses cuando se la mantiene a temperaturas inferiores a 10°C en lugares oscuros. Naturalmente, se puede utilizar la isomerasa de dextrosa inmovilizada, preparada de esta manera, inmediatamente para isomerización sin lavado con agua, haciendo pasar la solución de dextrosa a través de una columna compactada con la misma, bajo las condiciones que se describirán más adelante.

10

15

20

Más adelante se dará una evaluación para demostrar que las resinas de permutación aniónica fuertemente básicas del tipo MR o poroso, y las resinas de permutación aniónica débilmente básicas del tipo MR o proso, son excelentes por su poder de inmovilizar isomerasa de dextro-

25

sa, en comparación con otras resinas de permutación iónica.

EVALUACION DE RESINAS: ADSORCION DE ISOMERASA

5 Se compacta porciones de 3 g de cada una de diversas resinas de permutación iónica comerciales (Amberlite, Diaion) (húmedas) en respectivamente varias columnas diferentes. Después de haber equilibrado completamente las resinas mediante una solución de regulador tris-HCl 0,05 M, se hace pasar una solución de 10 250 unidades de isomerasa de dextrosa cristalina en la misma solución reguladora, a través de cada una de las columnas con un caudal de VS 3.

15 Cuando ha pasado la totalidad de la solución de isomerasa, se lava con agua cada una de las columnas de resina. Se retira entonces las resinas de sus respectivas columnas y se las mide con respecto a su actividad enzimática. En la Tabla II se indica los resultados.

TABLA II

Clasificación	Tipo Fundamental	Grupo de permutación iónica	Nombre de la resina	Gama de pH eficaz	Cantidad de enzima adsorbida (Unidades/g de resina húmeda)
Resina de permutación catiónica fuertemente ácida.	Gel	-SO ₃ M	Diaion SK-12	0 - 14	0
"	Poroso	"	" PK-204	"	0
	MR	"	Amberlite IR-118	"	0
Resina de permutación catiónica débilmente ácida.	Poroso	-COOM	Diaion WK-10	5 - 14	0
	MR	"	Amberlite CG-50	4 - 14	0
Resina de permutación aniónica fuertemente básica.	Gel	-N-(CH ₃) ₃ X	Diaion SA-11A	0 - 14	0,4
	Poroso	"	Amberlite IRA-400	"	0
	MR	"	Diaion PA-304	"	10
		"	" PA-303	"	19
		"	Amberlite IRA-900	"	6
		"	IRA-904	"	24
		"	IRA-938	"	21
		"	Diaion SA-21A	"	0,4
Resina de permutación aniónica fuertemente básica.	Gel	-N-(CH ₃) ₂ X C ₂ H ₄ OH	Amberlite IRA-410	"	0,1
	Poroso	"	Diaion PA-404	"	2
	MR	"	Amberlite IRA-411	"	0,3
	Gel	-N(R) ₂	" IRA-911	"	2
	Gel	-NH(R)	Amberlite IRA-68	0 - 9	0,2
Resina de permutación aniónica intermediamente básica.	Gel	-NH(R)	Diaion WA-11	"	0,8
Resina de permutación aniónica débilmente básica.	Poroso	-N(R) ₃ -NH(R) ₁ -NH ₂	Amberlite IR-45	"	1
	MR	-N(R) ₂	Diaion WA-30	"	9
		-N(R) ₂	Amberlite IRA-93	"	17

Según resulta evidente en la Tabla II, las resinas de permutación iónica, catiónica carecen de capacidad de adsorción. Sin embargo, las resinas de permutación aniónica fuertemente básicas del tipo MR o poroso y las resinas de permutación aniónica débilmente básicas del tipo MR o poroso, tienen excelente capacidad de adsorción de isomerasa de dextrosa.

EVALUACION DE RESINAS: ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

Se prepara 3 g de cada una de las varias diferentes clases de isomerasa de dextrosa inmovilizada, adsorbiendo la isomerasa sobre Amberlite IRA-904, IRA-938, IRA-93, IRA-911, Diaion PA-308, WA-30 y PA-404 respectivamente. Se compacta entonces cada una en una columna diferente.

Se examina entonces la estabilidad de cada uno de los especímenes de enzima inmovilizada, haciendo pasar una solución de glucosa al 60% a través de las columnas bajo las condiciones de isomerización que se explicarán más adelante. En el diagrama 1 se muestra los resultados obtenidos, en que el eje vertical representa el porcentaje de levulosa en la substancia sólida de la solución de azúcar que ha emergido de cada columna y el eje horizontal representa el tiempo de funcionamiento de la columna. En este diagrama, "a" representa la reacción de isomerización que se lleva a cabo con la isomerasa inmovilizada que se prepara con Amberlite IRA-904, "b" la que se lleva a cabo

con la enzima inmovilizada que se prepara con Amberlite IRA-93, "c" la que se lleva a cabo con la enzima inmovilizada que se prepara con Amberlite IRA-938, "d" la que se lleva a cabo con la enzima inmovilizada que se prepara con Diaion PA-308, "e" la que se lleva a cabo con la enzima inmovilizada que se prepara con Diaion WA-30, y "f" la que se lleva a cabo con la enzima inmovilizada que se prepara con Amberlite IRA-911 y con Diaion PA-404.

5.

10 En el caso de "a", el contenido de levulosa en el efluente permanece a 52% durante los 12 días iniciales, pero al disminuir posteriormente, se reduce a la mitad, o sea 26%, después de 17 días. En el caso de "b", el contenido de levulosa en el efluente permanece a 52% durante los 11 días iniciales pero, al reducirse posteriormente, disminuye a la mitad, o sea el 26%, después de 16 días. En el caso de "c", el contenido de levulosa en el efluente permanece a 52% durante los 10 días iniciales pero, al reducirse posteriormente, disminuye a la mitad, o sea 26%, después de 15 días. En el caso de "d", el contenido de levulosa en el efluente permanece a 52% durante los 6 días iniciales pero, al reducirse posteriormente disminuye a la mitad, o sea 26%, después de 10 días. En el caso de "e" el contenido de levulosa en el afluente permanece en 52% durante los 3 días ini-

15

20

25

ciales, pero, al disminuir posteriormente, se reduce a la mitad, o sea 26%, después de 6 días. En el caso de "f", el contenido de levulosa en el efluente disminuye a 26% dentro de 1 día.

5 El periodo durante el cual el porcentaje de levulosa disminuye a la mitad del valor inicial, se representa como semivida de la isomerasa inmovilizada. De acuerdo con el diagrama 2, resulta evidente que la isomerasa inmovilizada, preparada con Amberlite IRA-904 y
10 IRA-938, que son resinas de permutación aniónica fuertemente básicas del tipo MR, y con Amberlite IRA-93, que es una resina de permutación aniónica débilmente básica del tipo MR, se destaca considerablemente por su estabilidad, manifestando semividas de 17 días, 15 días y
15 16 días, respectivamente. De las resinas del tipo poroso, manifiestan resultados un poco menos deseables la Diaion PA-308, que es una resina de permutación aniómicamente fuertemente básica, y Diaion WA-30, que es una resina de permutación aniónica débilmente básica. La isomerasa
20 de dextrosa manifiesta una semivida de 10 días cuando se la inmoviliza con Diaion PA-308 y de 6 días cuando se la inmoviliza con Diaion WA-30.

Aunque son del mismo tipo MR y poroso, Amberlite
25 IRA-911 y Diaion PA-404, que son resinas fuertemente básicas, son de reducida capacidad de adsorción de la iso-

merasa de dextrosa, y la isomerasa inmovilizada resul-
tante tiene una semivida que es solamente 1 día. Otras
resinas del tipo de gel adsorben muy poca isomerasa y la
semivida de la isomerasa inmovilizada resultante es in-
5 inferior a 1 día. Según resulta evidente por estos resul-
tados, las resinas de permutación aniónica fuertemente
básicas del tipo MR o poroso, y las resinas de permuta-
ción aniónica débilmente básicas del tipo MR o poroso,
se destacan excelentemente por la inmovilización de la
10 isomerasa de dextrosa.

ISOMERIZACION

Se explica a continuación un método de isomerizar
dextrosa con isomerasa inmovilizada, obtenida de acuer-
do con la presente invención.

15 Ejemplos de dextrosa para el uso como materiales son:
dextrosa cristalina (contenido de dextrosa superior al
99%); dextrosa en polvo (aproximadamente 90%); jarabe de
glucosa (40 a 90%); e hidrol (50 a 60%).

Se disuelve cada una de estas clases de dextrosa a
20 una concentración comprendida entre 30 y 70% (de prefe-
rencia aproximadamente 60%) y se mezcla con $MgCl_2$ 0,001
- 0,01 M Se ajusta entonces la solución de azúcar resul-
tante a valores de pH de aproximadamente 7,0 a 8,5 (de
preferencia pH 7,5 a 8,0) mediante NaOH ó KOH. En este
25 caso, el $MgCl_2$ desempeña la misión de un activador de la

isomerasa. Se compacta en una columna la isomerasa in-
movilizada, que se prepara sobre resinas de permutación
aniónica fuertemente básicas del tipo MR o poroso, o
sobre resinas de permutación aniónica débilmente bási-
cas del tipo MR o poroso. Manteniéndose la columna a
5 temperaturas comprendidas entre 60 y 70°C, se hace pa-
sar la solución a través de la misma con caudales com-
prendidos entre 1 VS y 5 VS (comúnmente 1 a 2 VS).

Se determina la concentración de levulosa del
10 efluente, midiendo la rotación óptica de la solución
con un polarímetro o mediante el método de cisteína- H_2SO_4
-carbazol. En el caso de isomerizar dextrosa con isome-
rasa inmovilizada que se obtiene de acuerdo con la pre-
sente invención, resulta muy importante ajustar la solu-
15 ción de dextrosa a valores de pH de aproximadamente
7,0 a 8,5, debido a que, como resultado, aumenta la es-
tabilidad de la enzima inmovilizada.

Para demostrarlo, se compacta 10 g de Amberlite
20 IRA-904, que es una resina de permutación aniónica fuer-
temente básica del tipo MR, en cada una de cinco dife-
rentes columnas. Se equilibra cada columna con una solu-
ción reguladora de tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) que contiene
MgCl₂ 0,01 M. Después de la equilibración, se hace pasar
a través de cada columna una solución de 1000 unidades
25 de isomerasa cristalina, en la misma solución regulado-

ra. Se hace pasar entonces cinco soluciones de dextrosa al 60% separadas, cada una de las cuales contiene $MgCl_2$ 0,01 M a diferentes valores de pH de 6,0, 7,0, 7,5, 8,0 y 9,0, a través de las columnas respectivamente a 70°C y con un caudal de 1 VS.

5

Después de este procedimiento de isomerización, se mide la semivida de la isomerasa inmovilizada para cada uno de estos diferentes valores de pH. En el diagrama 2 se muestra los resultados obtenidos, estando indicados los valores de pH sobre el eje horizontal y estando trazadas las semividas sobre el eje vertical. Según resulta evidente en dicho diagrama, es deseable mantener el valor de pH de la solución, que se debe isomerizar, aproximadamente entre 7,0 y 8,5 de modo de mantener estable la isomerasa inmovilizada durante la reacción de isomerización.

10

15

Cuando se lleva a cabo isomerización continua de dextrosa de acuerdo con la presente invención, con isomerasa inmovilizada sobre Amberlite IRA-904, IRA-938 ó IRA-93, la cantidad de isomerasa que se requiere para producir 1 g de levulosa es aproximadamente 0,15 unidades. Cuando se emplea isomerasa inmovilizada sobre Diaion PA-308 ó WA-30, este valor es aproximadamente 0,3 a 0,4 unidades, respectivamente. Por otra parte, el procedimiento convencional de isomerización por tandas requiere aproximadamente 1 unidad de isomerasa para producir 1 g de levulosa. Por consiguiente, se puede reducir considera-

20

25

blemente la cantidad de isomerasa de dextrosa mediante un procedimiento de isomerización continua de acuerdo con la presente invención. Además, la solución resultante de azúcar isomerizado es casi incolora. Se la
5 puede refinar apropiadamente por desalificación con resinas de permutación iónica. Evita el inconveniente de decoloración con carbón activo, que comúnmente es necesaria en la isomerización por tandas.

En el caso de isomerizar dextrosa con isomerasa
10 inmovilizada sobre una resina de permutación aniónica macrorreticular fuertemente básica, de acuerdo con la presente invención, resulta ventajoso ajustar la solución de dextrosa a un valor de pH de aproximadamente 8,0, debido a que como resultado aumenta la estabilidad de la
15 enzima inmovilizada.

Para demostrarlo, se compacta en cada una de varias diferentes columnas, 10 g de Amberlite IRA-904, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR. Se equilibra cada columna con una solución
20 reguladora de tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) que contiene MgCl_2 0,01 M. Después de la equilibración, se hace pasar a través de cada columna una solución de 1000 unidades de isomerasa cristalina, en la misma solución reguladora. Se hace pasar entonces soluciones separadas de dextrosa
25 al 60% cada una de las cuales contiene MgCl_2 0,01 M y

se las ajusta a diferentes valores de pH de 6,0, 7,0, 8,0 y 9,0 respectivamente, a través de las columnas entre 60 y 70°C y con un caudal de aproximadamente 1 VS.

5 Después de este procedimiento de isomerización, se mide el contenido de levulosa del efluente de cada una de las columnas. En el diagrama 3 se muestra los resultados obtenidos, en que la escala vertical es el contenido de levulosa y el eje horizontal es el tiempo de operación para cada columna, en días.

10 En el diagrama 3, la letra "a" identifica la línea que es trazado del contenido de levulosa del efluente de la columna operada a pH 8,0; la letra "b" identifica la columna de pH 7,0; la letra "c" identifica la columna de pH 6,0; y la letra "d" identifica la columna de pH 15 9,0. Según resulta evidente en el diagrama, resulta deseable mantener el valor de pH de la solución de dextrosa, que se debe isomerizar, aproximadamente entre 7,0 y 8,5 de modo de mantener estable la isomerasa inmovilizada, durante la reacción de isomerización, y la isomerasa inmovilizada resulta más estable aproximadamente a un 20 pH de 8.

25 Si se lleva a cabo la reacción de isomerización continua aproximadamente a pH 8,0, se mantiene durante 15 días el régimen de isomerización en equilibrio (52% de

levulosa). Sin embargo, después de este tiempo, el régimen se reduce gradualmente, disminuyendo hasta la mitad del valor inicial (26% en 22 días. El tiempo en el cual el régimen de isomerización de una isomerasa inmovilizada disminuye a la mitad del valor inicial se define como su "semivida".

Según se demostrará más adelante, la pureza de la isomerasa de dextrosa, que se utiliza para inmovilización, ejerce poco efecto sobre la estabilidad de la isomerasa inmovilizada resultante, durante la reacción de isomerización.

Se compacta varias columnas con 12 g cada una de Amberlite IRA-904 (húmeda), que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR. Después de haberse equilibrado completamente la resina con una solución de $MgCl_2$ 0,01 M (pH 7,5), se alimenta respectivamente las columnas con: una solución de 1000 unidades de isomerasa cruda (extraída de células por autólisis); isomerasa de glucosa parcialmente purificada (separada del ácido nucleico mediante tratamiento con protamina); e isomerasa cristalina; en la misma solución. Se hace pasar entonces una solución de glucosa que contiene $MgCl_2$ 0,01 M (pH 8,0) a través de la columna a una temperatura de 70°C y un caudal de 1 VS. Se comprueba que las enzimas inmovilizadas, preparadas a partir

de estas clases de isomerasa de dextrosa, tienen semi-
vidas de aproximadamente 17 días cada una, no demostrando
efecto adjudicable a la pureza de la isomerasa ini-
cial. En el caso de preparar industrialmente isomerasa
5 inmovilizada, resulta por lo tanto ventajoso emplear iso-
merasa de glucosa cruda.

Cuando se isomeriza continuamente glucosa mediante
los métodos descritos más arriba, la solución de azú-
car que emerge de columnas de resina que contienen levu-
10 losa es inicialmente responsable del 52% de la substan-
cia sólida, según se indica en el diagrama 3. Se mantiene
este contenido de levulosa durante 10 a 15 días. Este
régimen de isomerización (52%) es el valor de equilibrio
que se alcanza cuando se lleva a cabo la isomerización
15 bajo las condiciones indicadas más arriba. Sin embargo,
después de esto, el régimen disminuye gradualmente, re-
duciéndose a la mitad del valor inicial, o sea 26%, en
17 a 22 días.

REACTIVACION DE LA COLUMNA PARA ISOMERIZACION

20

CONTINUA

Se explicará ahora el método de reactivar las colum-
nas cuya actividad de isomerización ha comenzado a dis-
minuir.

Primeramente se disuelve una isomerasa de dextrosa
25 en la misma solución de glucosa de la utilizada para la

isomerización. Se hace pasar entonces una cantidad de la solución de enzima resultante, que contiene 10 a 50 unidades (de preferencia 25 a 50 unidades) de isomerasa por cada gramo de resina húmeda, a través de las columnas al mismo caudal al cual se hace pasar la solución de glucosa que se debe isomerizar. A medida que pasa a través de la columna, es adsorbida más enzima, al mismo tiempo que se isomeriza la glucosa.

En esta manera, las columnas de resina recobran su regimen original de isomerización (52%). Además, la isomerasa inmovilizada, que ha sido reactivada, manifiesta la misma "semivida" que la original (17 a 22 días). Si se repite este procedimiento, resulta posible llevar a cabo la isomerización sin recompartar las columnas mientras duren las resinas de permutación iónica. Además, se puede mantener constante en la siguiente manera el contenido de levulosa en el efluente de las columnas de resina, a un determinado regimen de isomerización de hasta aproximadamente 52% (el valor de equilibrio normal). Cuando se comprueba que disminuye el régimen de isomerización, según se puede detectar por medición con un polarímetro, se reactiva de inmediato la columna de resina en la manera descrita más arriba, o también se puede reducir gradualmente el caudal de modo de mantener constante el régimen de isomerización, y reactivar entonces la columna

en un momento apropiado.

Una particularidad favorable de este método de isomerización continua es que el jarabe isomerizado resultante es casi incoloro. Para la refinación se necesita solamente la desalificación con resinas de permutación iónica. Por lo tanto, es innecesaria la decoloración con carbón activo antes de la venta.

Según se demostrará ahora, la isomerasa de dextrosa inmovilizada, que ha sido preparada adsorbiendo isomerasa sobre una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR o poroso, es superior a las preparadas con otras resinas de permutación iónica, en lo que se refiere a la capacidad de reactivación.

Según se describió más arriba, la Amberlite IRA-904, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR, la Amberlite IRA-93, que es una resina de permutación aniónica débilmente básica del tipo MR, y la Diaion WA-30 que es una resina de permutación aniónica débilmente básica del tipo poroso, resultan excelentes por su capacidad para adsorber isomerasa.

Se compacta 10 g de cada una de estas resinas (húmedas) respectivamente en tres diferentes columnas. Después de haber sido equilibradas las resinas completamente con una solución de $MgCl_2$ 0,01 M (pH 7,5), se hace pasar a través de cada una de las columnas una solución de iso-

m

merasa parcialmente purificada (1000 unidades) en la misma solución. A 70°C se hace pasar entonces glucosa, que contiene $MgCl_2$ 0,01 M (pH 8,0) a través de cada columna a un caudal de 1 VS.

5 Mediante un polarímetro se mide los regímenes de isomerización de las respectivas preparaciones de isomerasa producidas con las diferentes resinas de permutación iónica (porcentajes de levulosa de la sustancia sólida en los efluentes que han emergido de las diferentes columnas).

10

Todas las preparaciones de enzima muestran inicialmente un valor de levulosa del 52% en el efluente. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, este valor disminuye gradualmente. Cuando ha disminuido hasta 26% (la mitad del valor inicial), se hace pasar a través de la columna una solución de 250 unidades de isomerasa en una solución de glucosa que contiene $MgCl_2$ 0,01 M (pH 8,0). Se continúa entonces la reacción de isomerización continuando el paso de la solución de glucosa original a través de la columna.

15

20

En el diagrama 4 se muestra los resultados obtenidos. En este diagrama, (1) indica los resultados para Amberlite IRA-904, (2) para Amberlite IRA-93, y (3) para Diaion WA--30.

25

La isomerasa de dextrosa inmovilizada con Amberlite

IRA-904 recupera el régimen inicial de isomerización (52%) después de reactivación. Además, después de la activación demuestra la misma semivida inicial.

5 En el caso de isomerasa inmovilizada que ha sido preparada con Amberlite IRA-93 y Diaion WA- 30, no se logra por otra parte una regeneración completa del régimen inicial de isomerización. Después de la reactivación, la actividad aumenta solamente un poco, según se puede ver en el diagrama 4, cuando se emplea como portadores estas resinas de permutación aniónica débilmente
10 básicas.

Se demostrará ahora la presente invención mediante varios ejemplos específicos. Todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

15

EJEMPLO 1

ISOMERIZACION CON ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE AMBERLITE

IRA 904

20 En una columna (3 x 30 cm), se compacta 100 g de Amberlite IRA-904, húmeda, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR (volumen de lecho: 150 ml), y se equilibra con una solución reguladora de tris HCl 0,05 M (pH 7,5). Se hace pasar entonces a través de la columna 400 ml de una solución de isomerasa de dextrosa parcialmente purificada (que
25 contiene 10.000 unidades de isomerasa) a un caudal de

1 VS. Cuando ha pasado la totalidad de la solución de isomerasa a través de la columna, se hace pasar 2⁰⁰⁰ ml de agua a través de la columna para eliminar por lavado cualquier isomerasa no adsorbida. Se retira entonces de la columna la resina de permutación iónica y se la mide con respecto a su actividad de isomerasa de glucosa. Como resultado, se comprueba que cada gramo de la resina (húmeda) tiene una actividad de 28 unidades.

En una columna (25 x 20 cm) que compacta 50 g de esta isomerasa inmovilizada (húmeda) (volumen del lecho 75 ml). Manteniendo la columna a una temperatura de 70°C, se hace pasar a través de ella una solución de glucosa al 60% ajustada a pH 8,0, con un caudal de 1 VS. El contenido de levulosa del efluente es inicialmente 52% de la substancia sólida y este valor se mantiene durante 15 días. Sin embargo, 20 días más tarde el régimen de isomerización disminuyó al 26%, que es la mitad del valor inicial.

EJEMPLO 2

ISOMERIZACION CON ENXIMA INMOVILIZADA SOBRE DIARION PA-308

En una columna (3 x 30 cm) se compacta 100 g de Diarion PA-308, húmeda que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo poroso (volumen de lecho 150 ml), y se equilibra con una solución de MgCl₂ 0,01 M ajustada a pH 8,0. Se hace pasar entonces a

través de la columna 400 ml de una isomerasa parcialmente purificada en la misma solución (que contiene 10.000 unidades de isomerasa) con un caudal de 3 VS. Cuando ha pasado la totalidad de la solución de isomerasa a través de la columna, se hace pasar 2000 ml de H₂O a través de la columna para eliminar por lavado cualquier isomerasa no adsorbida. Se retira entonces de la columna la resina de permutación iónica y se mide su actividad de isomerasa. Como resultado, se comprueba que cada gramo de la resina (húmeda) tiene una actividad de 20 unidades.

En una columna (2,5 x 20 cm) se compacta 50 g de esta isomerasa inmovilizada (húmeda) volumen del lecho 75 ml). Manteniendo la columna a una temperatura de 70°C, se hace pasar a través de la misma una solución de glucosa al 60% que contiene MgCl₂ 0,01 M y se ajusta a pH 8,0, con un caudal de 1 VS. El contenido de levulosa del efluente es inicialmente 52% de la sustancia sólida. Este valor se mantiene durante 6 días y luego disminuye al 26%, que es la mitad del valor inicial, en el transcurso de 10 días.

EJEMPLO 3

ISOMERIZACION CON ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE AMBERLITE

IRA-93

En una columna (3 x 30 cm) se compacta 100 g de

En una columna (3 x 30 cm) se compacta 100 g de Amberlite IRA-93, húmeda, que es una resina de permutación aniónica débilmente básica del tipo MR (volumen de lecho 164 ml), y se equilibra con una solución de $MgCl_2$ 0,01 M ajustada a pH 8,0. Se hace pasar entonces a través de la columna 400 ml de una solución de isomerasa parcialmente purificada en la misma solución (que contiene 10.000 unidades de isomerasa), con un caudal de 3 VS. Después de haber pasado a través de la columna la totalidad de la solución de isomerasa, se hace pasar 2.000 ml de H_2O a través de la columna de modo de eliminar por lavado cualquier isomerasa no adsorbida. Se retira entonces la resina de la columna y se la mide con respecto a su actividad de isomerasa. Cada gramo de la resina (húmeda) tiene una actividad de 17 unidades.

En una columna (2,5 x 20 cm) se compacta 50 g de esta isomerasa inmovilizada (húmeda) (volumen del lecho 82 ml). Manteniendo la columna a una temperatura de 70°C, se hace pasar a través de la misma una solución de glucosa al 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M y se ajusta a pH a 8,0, con un caudal de 1 VS. El contenido de levulosa del efluente es inicialmente 52% de la sustancia sólida. Este valor se mantiene durante 10 días y luego disminuye al 26%, que es la mitad del valor inicial, en el transcurso de 15 días.

EJEMPLO 4

ISOMERIZACION CON ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE AMBERLITE

IRA-904

5 En una columna (3 x 30 cm) se compacta 100 g de Amberlite IRA-904 húmeda, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR (volumen del lecho 150 ml), y se equilibra con una solución de glucosa al 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M, ajustada a pH 8,0.

10 Se hace pasar entonces a través de la columna 2500 ml de una solución de isomerasa cruda en la misma solución de glucosa (que contiene 10.000 unidades de isomerasa de glucosa), con un caudal de 3 VS. Después de haber pasado a través de la columna la totalidad de la solución de isomerasa, se hace pasar 4000 ml de agua a
15 través de la columna de modo de eliminar por lavado cualquier isomerasa de glucosa no adsorbida. Se retira entonces de la columna la resina y se mide su actividad de isomerasa. Cada gramo de la resina (húmeda) demuestra una actividad de 15 unidades.
20

En una columna (2,5 x 20 cm) se compacta 50 g de esta isomerasa inmovilizada (volumen del lecho 75 ml). Manteniendo la columna a una temperatura de 70°C, se hace pasar a través de la misma una solución de glucosa al
25 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M y se ajusta a pH 8,0, con

un caudal de 1 VS. El contenido de levulosa del efluente es inicialmente 52% de la sustancia sólida. Este valor se mantiene durante 13 días y luego disminuye al 26%, que es la mitad del valor inicial, en el transcurso de 18 días.

EJEMPLO 5

DEMOSTRACION CON UNA CONCENTRACION DE DEXTROSA DE 60%

Se prepara 50 g de la isomerasa inmovilizada, adsorbiendo isomerasa sobre resina Amberlite IRA-904 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se compacta la isomerasa fijada sobre la resina en una columna de 2,5 x 20 cm (volumen del lecho 75 ml). Se hace pasar entonces solución de glucosa al 60%, pH 8,0, que contiene $MgCl_2$ 0,01 M a través de la columna a 60°C y se recoge el efluente. El contenido de levulosa del efluente es inicialmente 52% de la sustancia sólida. Este valor se mantiene durante 10 días y luego disminuye gradualmente a 26% en 40 días.

EJEMPLO 6

ISOMERIZACION CONTINUA CON LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE AMBERLITE-904

En una columna (2,5 x 20 cm) se compacta 50 g de Amberlite IRA-904, húmeda, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR. Con la resina equilibrada mediante una solución de $MgCl_2$ 0,01 M,

se ajusta a pH 8,0, se hace pasar a través de la columna 3000 ml de una solución de isomerasa de dextrosa cruda en la misma solución (que contiene 5000 unidades de isomerasa) con un caudal de 3 VS. Después de haber pasado la totalidad de la solución de isomerasa a través de la columna, se hace pasar a través de la misma una solución de dextrosa al 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M y ajustada a pH 8,0, con un caudal de 1 VS a 70°C.

Se mide el régimen de isomerización mediante un polarímetro y se expresa como porcentaje de levulosa de la substancia sólida en el efluente de la columna. El régimen permanece en 52% (valor de equilibrio) durante los primeros 12 días. Sin embargo, después de esto disminuye gradualmente y se ha reducido a 26% al decimo séptimo día.

Se hace pasar entonces a través de la columna 1500 ml de una solución de isomerasa en una solución de dextrosa al 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M y se ajusta a pH 8,0 (que corresponde a 2500 unidades de isomerasa), con un caudal de 1VS. Se continúa entonces la reacción de isomerización haciendo pasar la misma solución de dextrosa (sin isomerasa) a través de la columna bajo las mismas condiciones que las utilizadas para la reacción de isomerización.

Como resultado de este procedimiento, la columna de

resina recupera su régimen original de isomerización de 52%, y conserva este valor durante otros 12 días. Sin embargo, en los 5 días siguientes, el régimen de isomerización disminuye al 26%. Se reactiva entonces
5 nuevamente la columna de resina en la misma manera. Retorna nuevamente por completo a su actividad inicial.

EJEMPLO 7

ISOMERIZACION CONTINUA CON ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE

DIAION PA-308

10 En una columna (2,5 x 2,0 cm) se compacta 50 g de Diaion PA-308 húmeda, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo poroso. Después de haber equilibrado la resina con una solución de $MgCl_2$
15 0,01 M ajustada a pH 8,0, se hace pasar a través de la columna 200 ml de una solución de isomerasa de dextrosa parcialmente purificada en la misma solución (que contiene 5000 unidades de isomerasa) con un caudal de 1 VS.

20 Se hace pasar entonces a través de la columna una solución de dextrosa al 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M y se ajusta a pH 8,0, con un caudal de 3 VS manteniendo la columna a 70°C. Mediante un polarímetro se mide continuamente el régimen de isomerización. Permanece a 52% durante los 3 días iniciales, y comienza a disminuir gradualmente después. Se reduce entonces el caudal de la solución de dextrosa de tal manera que se logra mantener a
25

52% el régimen de isomerización. Este procedimiento se hace posible mediante la reducción del caudal de la solución de dextrosa a razón de 0,25 VS cada día.

10 días después del momento de iniciar la reducción del caudal (cuando el caudal disminuyó hasta 0,5 VS), se hace pasar a través de la columna 100 ml de una solución de isomerasa en una solución de dextrosa al 60% que contiene $MgCl_2$ 0,01 M y ajustada a pH 8,0 (que corresponde a 2500 unidades de isomerasa de glucosa), con un caudal de 0,5 VS. Después de esto se continúa la reacción de isomerización haciendo pasar la solución de dextrosa (sin isomerasa) a través de la columna al caudal inicial, es decir 3VS. Repitiendo este procedimiento, resulta posible continuar la isomerización a un régimen de isomerización de 52% mientras dura la resina de permutación iónica. Resulta innecesario recompactar la columna durante el periodo.

EJEMPLO 8

ISOMERIZACION CONTINUA CON ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE

AMBERLITE IRA-904

En una columna de 2,5 x 20 cm (volumen del lecho 75 ml) se compacta 50 g de resina Amberlite IRA-904 húmeda, que es una resina de permutación aniónica fuertemente básica del tipo MR. Se equilibra la resina con una solución de $MgCl_2$ 0,01 M ph 8,0 y luego se hace pasar a tra-

vés de la columna 200 ml de solución de isomerasa que contiene 5000 unidades de isomerasa, con un caudal de 1 VS.

5 Después de haber pasado la totalidad de la solución de isomerasa a través de la columna, se hace pasar a través de la misma una solución de dextrosa al 60%, pH 8,0, que contiene $MgCl_2$ 0,01 M con un caudal de 2,5 VS a 60°C. Con un polarímetro se mide continuamente el régimen de isomerización del efluente. Se comprueba el régimen de
10 isomerización es inicialmente 45% y se le mantiene constante (45%) reduciendo el caudal de la solución de dextrosa a razón de 0,04 VS por día. Cuando el caudal disminuyó por debajo de 0,5 VS después de 50 días, se hace pasar a través de la columna 5000 unidades de isomerasa, disuelta
15 en 200 ml de la solución de dextrosa, a razón de 0,5 VS para reactivar la resina.

Se continúa entonces la reacción de isomerización haciendo pasar la solución de dextrosa (sin isomerasa) a través de la columna con un caudal de 2,3 VS, lo cual
20 da un régimen de isomerización del 45%. Se reduce el caudal en la misma manera que la mencionada más arriba. Repitiendo este procedimiento, resulta posible continuar la isomerización al nivel de 45%, mientras dura la resina.

CONCLUSIONES

25 En general se puede usar las preparaciones de enzima inmovilizadas, de acuerdo con la presente invención, para isomerizar dextrosa a un pH comprendido en la gama de

aproximadamente 6 a 9, y a una temperatura comprendida en la gama de aproximadamente 20 a 80°C. Sin embargo, aunque el procedimiento de la presente invención no se encuentra necesariamente limitado a estas gamas, la gama
5 más preferida para el pH es 7,0 a 8,5, o más preferiblemente 8,0, y para la temperatura 60 a 70°C. La solución de dextrosa que se debe isomerizar puede tener casi cualquier concentración utilizable deseada. Para fines prácticos, una concentración de 40% de azúcar, en un jarabe
10 de glucosa, representa por lo general el límite superior de utilidad práctica. Sin embargo, el procedimiento puede operarse a cualquier concentración a la cual se produzca contacto, ya sea en una configuración por tandas o continua.

15 Las resinas que se utilizan para poner en práctica la presente invención son en forma de partículas, para permitir buenas propiedades hidráulicas en el reactor de isomerización. Las partículas de la resina se caracterizan por la presencia, a través de toda la matriz polímera de cada partícula, de una red de poros que provee
20 una elevada área superficial para adsorción y contacto.

Aunque se ha descrito aquí principalmente los compuestos de enzima inmovilizada principalmente con referencia al uso en columnas, son también útiles para la
25 isomerización en cualquier forma en la cual se los puede

llevar convenientemente en contacto con el licor de alimentación de dextrosa. Por lo tanto se puede utilizar columnas, prensas de filtro o cualquier clase de dispositivos o sistemas de contacto.

5 Aunque se ha descrito la presente invención con referencia a formas específicas de llevarla a la práctica, se comprenderá que es susceptible de otras modificaciones y que la presente solicitud abarca cualquier variante, uso o adaptación de la invención, siempre que
10 en general sigan los principios de la presente invención e incluyendo cualquier diferencia con la presente invención que quede comprendida dentro de la práctica conocida o acostumbrada en la técnica a la cual pertenece la presente invención y tal como se la puede aplicar a las particularidades esenciales mencionadas más arriba, y dentro
15 de lo que quede comprendido en el alcance de las reivindicaciones que se acompaña.

El significado de las magnitudes representadas en las gráficas de los dibujos es el siguiente:

20 Figuras 1, 3 y 4.-

Eje de ordenadas : % de levulosa (en substancia sólida)

Eje de abscisas : tiempo de operación en columna (días)

Figura 2.-

Eje de ordenadas : semi-vida (días)

Eje de abscisas : pH

5

- REIVINDICACIONES -

10

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

15

1ª.- Un procedimiento para preparar un compuesto de isomerasa de dextrosa inmovilizada, caracterizado por adsorber isomerasa de dextrosa sobre una resina de permutación aniónica fuertemente básica de tipo macrorreticulado o poroso poniendo una solución que contiene isomerasa de dextrosa en contacto con la resina de permutación iónica.

20

25

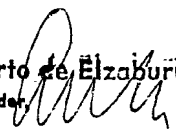
2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la

Esta Memoria consta de cuarenta y ocho
hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 06. OCT. 1976

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder



23-9-76
VGD.

- 48 -

FIG. 1

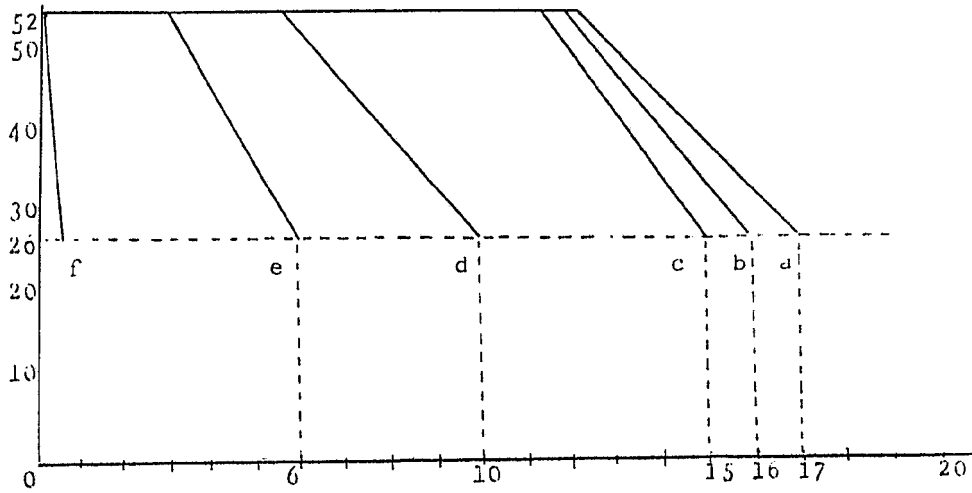
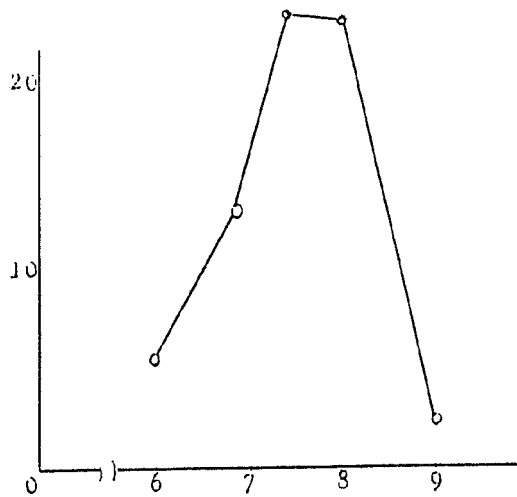


FIG. 2



Alberto de Elzabura
Por Poder

FIG. 3

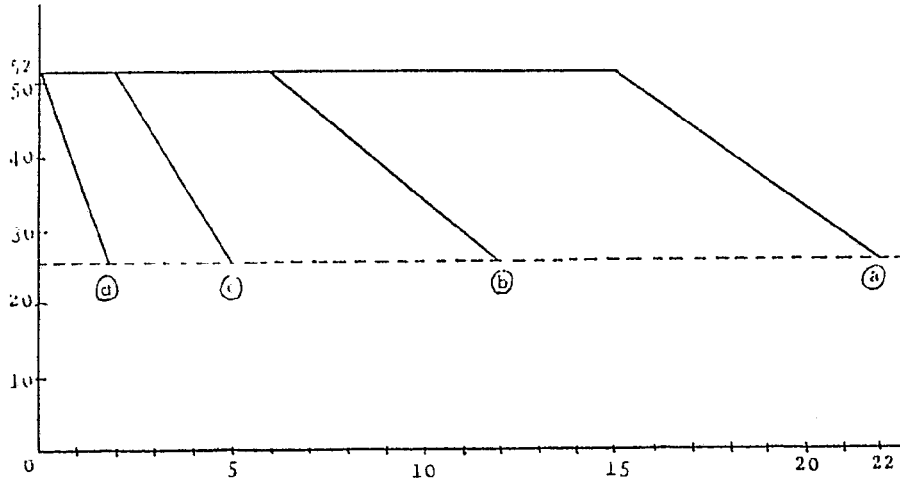
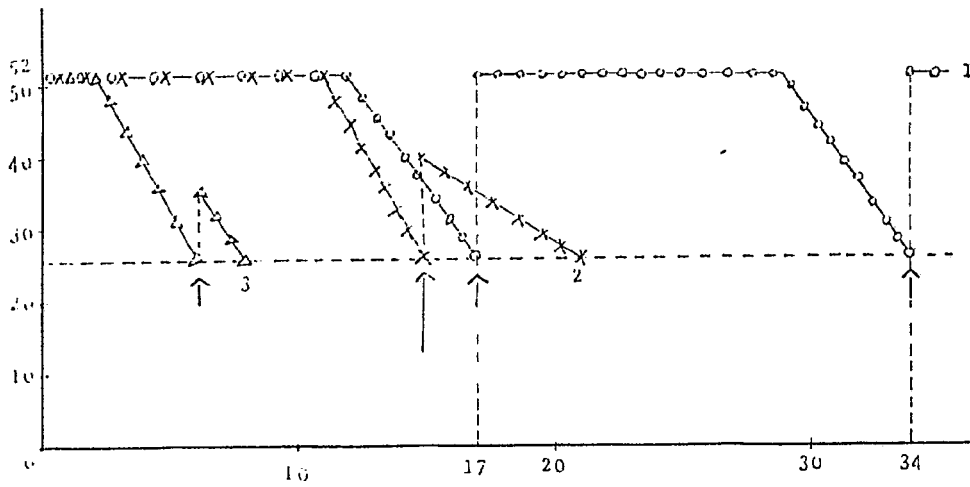


FIG. 4



Alberto de Elizaburu
Por Poder,