

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

20 JUL. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES

11

21

22

NUMERO

457.508

FECHA DE PRESENTACION

4-4-1977

A 1

PATENTE DE INVENCIÓN

P.- 65.488
U.S. 673.755
Spain

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
673.755	5-4-76	E.U.A.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C13K	
54 TITULO DE LA INVENCIÓN		
"UN PROCEDIMIENTO PARA LLEVAR A CABO REACCIONES ENZIMATICAS"		
71 SOLICITANTE (S)		
MILES LABORATORIES, INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana 46514, Estados Unidos de América		
72 INVENTOR (ES)		
Kjell Ovreeide y Francis Henry Verhoff		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ		

ANTECEDENTES Y TECNICA ANTERIOR

Las enzimas son materiales bien conocidos que se emplean generalmente como catalizadores para efectuar reacciones específicas. Por ejemplo, la glucosa-isomerasa cataliza la isomerización de glucosa (dextrosa) a fructosa. Una amilasa cataliza la hidrólisis de almidón para formar fragmentos que se identifican como dextrosa, maltosa y azúcares superiores. Una glucosa-oxidasa puede catalizar la oxidación de glucosa, una catalasa puede activar la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y una amiloglucosidasa cataliza la hidrólisis de almidón para producir glucosa. Tales reacciones enzimáticas pueden tener lugar en un reactor discontinuo, mezclando la enzima en forma de disolución o dispersada con los demás componentes de la reacción. Se prefiere inmovilizar la enzima sobre un soporte adecuado y hacer fluir continuamente los materiales de partida a través de un lecho de la enzima inmovilizada, para obtener un producto final que tiene las características deseadas.

En la técnica anterior era sabido que la enzima inmovilizada pierde parte de su actividad por el uso prolongado. Para compensar esta actividad enzimática reducida, en la técnica anterior se empleaban dos métodos generales. A medida que la actividad enzimática disminuye, el caudal del material de partida se disminuye también para aumentar el tiempo de contacto entre la enzima inmovilizada y el material que se hace reaccionar. Esta técnica puede dar un producto que tiene las conversiones deseadas, pero tiene la desventaja de llegar finalmente a caudales de producción inútilmente bajos.

1 Otra técnica anterior implica un cambio en las
condiciones de reacción para compensar la reducción de acti
vidad enzimática. Un ejemplo es la Patente de los EE.UU.
nº 3.847.741, que describe que la glucosa-isomerasa inmovi-
5 lizada puede exponerse a temperaturas elevadas para aumen-
tar la actividad enzimática reducida por la otra razón, y
prolongar así la vida útil de la enzima. Esta técnica tie-
ne la desventaja de requerir un cambio en las condiciones
de trabajo para conseguir una velocidad de producción sus-
10 tancialmente constante y una composición de producto sustan-
cialmente constante. En cualquier caso, esta técnica es
sólo una solución a corto plazo, ya que finalmenté las con-
diciones de reacción alteradas son tan severas que deterio-
ran la enzima.

15 Así, se precisa en la técnica de las enzimas
un procedimiento que pueda tener un caudal sustancialmente
constante, una velocidad de producción sustancialmente cons-
tante, y condiciones de reacción sustancialmente constan-
tes. Tal procedimiento minimizaría cualquier fluctuación
20 en el proceso global, tanto aguas arriba como aguas abajo
del reactor de la enzima.

RESUMEN DE LA INVENCION

25 Según la presente invención, se proporciona un
procedimiento perfeccionado para efectuar reacciones enzi-
máticas, que comprende hacer pasar un material de partida
a través de al menos dos reactores conectados en serie, con-
teniendo conjuntamente dichos reactores material de enzima
que aporta una actividad enzimática total suficiente para
obtener la composición de producto deseada a un caudal pre-
30 viamente determinado y bajo condiciones de reacción prede-

1 terminadas, y después mantener la actividad enzimática glo-
bal total de los reactores de la serie en un valor sustan-
cialmente constante a pesar de la reducción en la actividad
de dicha enzima con el tiempo, añadiendo periódica o conti-
5 nuamente a uno de los reactores de la serie material de enzi-
ma suficiente para compensar dicha reducción en la activi-
dad de la enzima.

La presente invención comprende también un apa-
rato específico para efectuar tal procedimiento de reacción
enzimática.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un dibujo esquemático de varios
reactores enzimáticos y las tuberías y válvulas asociadas,
que se emplean para realizar una forma del proceso y el apa-
rato de la presente invención, y en la que se muestran va-
rios ciclos de funcionamiento en las subfiguras (a)-(g).

La Figura 2 es un gráfico que ilustra las rela-
ciones de la duración de un ciclo en función de la utiliza-
ción de enzima y la altura de la columna de enzima en el -
reactor cuando se emplea la presente invención;. En dicha
figura en el eje horizontal se ciclo en días, En el eje ver-
tical izquierdo la utilización relativa de la enzima. En el
eje vertical derecho la altura relativa de la columna,

48 = estabilidad enzimática media

49 = enzima más estable

50 = enzima menos estable

La Figura 3 es un gráfico que ilustra las rela-
ciones del tiempo de funcionamiento en el eje horizontal en
días en función de la adición de enzima en el eje de ordena-
das en columnas/día, cuando se pone en práctica el procedi-

1 miento de la presente invención. Los puntos representados por $\square \triangle \nabla x +$ se refieren a ciclos de 20, 30, 40, 50, 60 y 70 días.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 Con fines ilustrativos, el procedimiento de la presente invención se describirá en detalle con respecto a la isomerización de glucosa a fructosa, catalizada por glu-
cosa-isomerasa. Es sabido en la técnica que esta reacción enzimática puede convertir una disolución que contiene glu-
10 cosa, en la que sustancialmente todo el contenido de azúcares es glucosa, en una disolución que contiene fructosa en la que los sólidos disueltos contienen alrededor de 43 a 45 por ciento en peso de fructosa. Esta conversión tiene lugar a un pH de alrededor de 7 a 8 y a una temperatura de alrede-
15 dor de 60°C.

La glucosa-isomerasa útil en este procedimiento es bien conocida, y puede obtenerse de varias fuentes. La enzima puede inmovilizarse también por varias técnicas bien conocidas. Se prefiere que la glucosa-isomerasa esté produ-
20 cida a partir de Streptomyces olivaceus NRRL 3583 o mutantes del mismo, como se describe en la Patente de los EE.UU. n° 3.625.828, y se inmovilice usando glutaraldehído como se describe en lá Patente de los EE.UU. n° 3,779,869.

La disolución que contiene glucosa usada como ma-
25 terial de partida puede ser cualquiera de los jarabes bien conocidos obtenidos por conversión por ácido o por enzimas de almidón, tal como almidón de maíz. En particular, el material de partida es una disolución de azúcares inferiores obtenidos por conversión de almidón por medio de amilasa y
30 amiloglucosidasa. Esta disolución contiene preferiblemente

alrededor de 30 por ciento en peso de sólidos disueltos, de los que alrededor del 95 por ciento en peso son glucosa.

Haciendo referencia a la Figura 1(a), se describirá el nuevo procedimiento con referencia a dos reactores enzimáticos 10 y 11 en serie. Puede usarse un tercer reactor 12 cuando uno de los demás reactores se retira para vaciarlo. Todos los reactores son de construcción similar y tienen una válvula de entrada indicada por 13, 14 y 15, respectivamente, y una válvula de salida indicada por 16, 17 y 18, respectivamente. La entrada 19 de material de partida comunica con la válvula de entrada 13 a través de la válvula 20 y la conducción 21. La entrada 19 puede comunicar con la válvula de entrada 14 por medio de la válvula 22 y la conducción 23. La entrada 19 puede también comunicarse con la válvula de entrada 15 a través de la válvula 24, la conducción 25, la válvula 26 y la conducción 27. La salida de producto 28 puede comunicar con las válvulas de salida 18, 17 y 16 a través de la válvula 29, la conducción 30, la válvula 31, la conducción 32, la válvula 33, la conducción 34, la válvula 35 y la conducción 36 en serie, y a través de la conducción en paralelo de la válvula 37, la conducción 38 y la válvula 39, tal como se muestra. La conducción 34 está conectada con la conducción 23 a través de la conducción 40, la válvula 41 y la conducción 42. La conducción 32 está conectada con la conducción 27 a través de la conducción 43, la válvula 44, la conducción 45, y la válvula 46, tal como se muestra.

Al comienzo de un ciclo de funcionamiento inicial o una subsiguiente similar, el reactor 10 contiene suficiente material de glucosa-isomerasa inmovilizado 47, que

1. tiene una actividad adecuada, de tal modo que un sólo paso
de disolución que contiene glucosa a través del mismo en
condiciones adecuadas de temperatura, pH y tiempo, da un
producto que tiene el contenido de fructosa deseado. La tra
5 yectoria de paso de la disolución que contiene glucosa es a
través de dos reactores 10 y 11 en serie. Como se muestra
en la Figura 1(a), esta trayectoria desde la entrada 19 a
la salida 28 atraviesa la válvula 20, la conducción 21, la
válvula 13, el reactor 10, la válvula 16, la conducción 36,
10 la válvula 35, la conducción 34, la conducción 40, la válvu
la 41, la conducción 42, la conducción 23, la válvula 14,
el reactor 11, la válvula 17, la conducción 32, la válvula
31, la conducción 30 y la válvula 29. Inicialmente, el reac
tor 11 puede estar vacío o puede contener una pequeña can
15 tidad de material de enzima 47, como se explicará más ade
lante.

A medida que prosigue la reacción de isomeriza
ción, la actividad del material de enzima 47 en el reactor
10, así como cualquier enzima 47 en el reactor 11, empieza
20 a disminuir. Entonces se hacen adiciones periódicas de en
zima de nueva aportación 47 al reactor 11, a través de una
entrada adecuada (que no se muestra), para mantener la acti
vidad enzimática total en los reactores 10 y 11 en un nivel
deseado sustancialmente constante. Se entiende que podría
25 hacerse una adición lenta continua de enzima de nueva apor
tación 47 al reactor 11 para conseguir el mismo resultado.
Esto permite que el caudal de material líquido desde la en
trada 19 a la salida 28 se mantenga en un nivel sustancial
mente constante, manteniendo al mismo tiempo sustancialmen
30 te constantes las condiciones de reacción en los reactores

1 10 y 11, y un contenido de producto sustancialmente constan-
te a la salida 28.

5 Finalmente, el reactor 11 se llenará de enzima
47 hasta el mismo nivel de la enzima 47 en el reactor 10.
Esto se muestra en la Figura 1(b). La actividad de la en-
zima 47 en el reactor 10 ha disminuído entonces sustancial-
mente, y puede desecharse. Para retirar el reactor 10 de
la serie de reactores y añadir el reactor 12 a la misma,
10 las válvulas 13, 16, 22, 41, 44, 46, 15, 18 y 31 se pasan
a las posiciones mostradas en la Figura 1(c). La trayecto-
ria de paso del fluido desde la entrada 19 a la salida 28
se hace entonces a través de la válvula 20, la conducción
21, la válvula 22, la conducción 23, la válvula 14, el reac-
tor 11, la válvula 17, la conducción 32, la conducción 43,
15 la válvula 44, la conducción 45, la válvula 46, la conduc-
ción 27, la válvula 15, el reactor 12, la válvula 18, la
conducción 30 y la válvula 29. Inicialmente, el reactor
12 puede estar vacío, o puede contener una pequeña canti-
dad de enzima 47, como se explicará más adelante.

20 El período de tiempo entre la entrada inicial
de material de partida en la serie de reactores (reactor
10) y el llenado del reactor de la serie que inicialmente
contiene menos enzima (reactor 11) hasta sustancialmente
el mismo nivel de enzima que los demás reactores, se defi-
25 ne como ciclo de funcionamiento. Al final del ciclo de -
funcionamiento mostrado, el primer reactor de la serie -
(reactor 10) contiene la actividad de enzima más agotada,
y se retira de la serie para su vaciado. Un reactor sin
llenar, que contiene sustancialmente menos material de en-
30 zima que los demás reactores (reactor 12) se añade como -

1 último reactor de la serie, tal como se ha descrito antes.
Después se hacen al reactor recién añadido 12 adiciones pe-
ríódicas o continuas de enzima, a través de una entrada ade-
cuada (que no se muestra) en un nuevo ciclo de funcionamien-
5 to. Esto se muestra en las Figuras 1(c) y 1(d). El reac-
tor 10 se vacía a través de una salida adecuada (que no se
muestra);

Al final del segundo ciclo de funcionamiento,
las válvulas se pasan a las posiciones mostradas en la Fi-
10 gura 1(e) situación en la que el reactor 11 contiene la ac-
tividad de enzima más agotada y se retira de la serie, el
reactor 12 se transforma en el primer reactor, y el reactor
10 anteriormente vaciado se añade como segundo reactor de
la serie. Con esta disposición, la trayectoria de paso del
15 fluido desde la entrada 19 hasta la salida 28 se hace a tra-
vés de la válvula 24, la conducción 25, la válvula 26, la
conducción 27, la válvula 15, el reactor 12, la válvula 18,
la conducción 30, la válvula 31, la conducción 32, la vál-
vula 33, la conducción 34, la conducción 40, la válvula 41,
20 la conducción 42, la conducción 23, la válvula 22, la con-
ducción 21, la válvula 13, el reactor 10, la válvula 16, la
la conducción 36, la válvula 39, la conducción 38 y la vál-
vula 37. Después se hacen adiciones periódicas o continuas
de enzima al reactor 10 recién añadido, a través de una en-
25 trada adecuada (que no se muestra). Después se vacía el -
reactor 11 a través de una salida adecuada (que no se mues-
tra).

Al finalizar el tercer ciclo de funcionamiento
mostrado en la figura 1(f), las válvulas se pasan a las po-
30 siciones mostradas en la Figura 1(g), situación en la que -

1 el reactor 12 se retira de la serie, y el reactor 10 se trans-
forma en el primer reactor de la serie, y el reactor 11 an-
tes vaciado se añade como segundo reactor de la serie. El
5 reactor 12 se vacía a través de una salida adecuada (que no
se muestra). La trayectoria del fluido mostrada en la Figu-
ra 1(g) es idéntica a la de la Figura 1(a), y los tres ci-
clos de funcionamiento antes descrito pueden repetirse tan
frecuentemente como se desea para efectuar una operación con-
tinua.

10 Por la descripción anterior puede verse que ca-
da reactor está en marcha durante dos ciclos de funcionamien-
to. Cada reactor inicialmente vacío se va llenando durante
un ciclo, y después se usa como primer reactor de la serie
durante el ciclo siguiente. Si aún hay alguna actividad en-
15 zimática residual en un reactor cuando se retira de la se-
rie, el reactor que se añade a la serie ha de contener una
cantidad inicial de enzima de actividad sustancialmente -
igual a tal actividad residual, para mantener la actividad
global en la serie en un nivel sustancialmente constante.

20 Aunque en la descripción anterior se emplean
dos reactores en serie con un tercer reactor vacío en espera
de ser empleado, se entiende que, en ciertas condiciones de
trabajo, puede prescindirse de este tercer reactor. En es-
te caso, el reactor agotado podría vaciarse rápidamente y
25 después conectarse de nuevo como reactor vacío o como reac-
tor que contiene una pequeña cantidad de enzima, sin afectar
sustancialmente a la operación global.

30 En la descripción que sigue se cuantifican algu-
nas de las condiciones de trabajo implicadas en la práctica
del procedimiento de la presente invención. Se ha encontrado,

1 por ejemplo, que la glucosa-isomerasa inmovilizada de estabi-
lidad media puede mantener su plena actividad durante alrede-
dor de 20 días de funcionamiento. Después disminuye a alrede-
dor del 50 por ciento de su actividad al cabo de 40 días, y a
5 una actividad de alrededor de cero al cabo de 60 días. Para
mostrar los efectos de enzimas que tienen diversas velocida-
des de descenso de actividad, se describirá ahora el funcio-
namiento del procedimiento mejorado usando, respectivamente,
una enzima de estabilidad media, una enzima menos estable y
10 una enzima más estable. En uno de los casos se supone que la
enzima es menos estable que el promedio, y su actividad perman-
ece constante durante 20 días, disminuyendo hasta cero al ca-
bo de 40 días. En otro caso se supone que la enzima es más
estable que el promedio, y su actividad permanece constante
15 durante 20 días, descendiendo a cero al cabo de 100 días. Se
suponen también ciertas definiciones y condiciones. Se supone
que la velocidad de producción del producto deseado es cons-
tante en todo momento, se supone que el caudal de material de
partida es constante, y también que son constantes las condi-
20 ciones de reacción de temperatura y pH, así como la actividad
inicial de enzima por unidad de volumen de lecho compacto. La
utilización de enzima se define como unidad cuando uno de los
reactores se hace funcionar 20 días y la enzima se desecha.
La altura de columna o profundidad del lecho de enzima inmovi-
25 lizada se define como la unidad cuando un sólo reactor hecho
funcionar en las condiciones anteriores tiene una enzima de
una actividad del 100 por cien y da un producto que tiene las
características deseadas. Todos los resultados que se discu-
ten más adelante se basan en condiciones de régimen o equili-
30 brio, que generalmente se alcanzan al cabo de varios ciclos

1 de funcionamiento.

La Figura 2 es una gráfica que ilustra las relaciones de la duración del ciclo de funcionamiento en función de la utilización de la enzima y la altura de las columnas de enzima en los reactores distintos al reactor que inicialmente contiene menos enzima que los demás. Las curvas llenas (continuas) 48 representan los resultados cuando se emplea una enzima de estabilidad media (la actividad desciende a cero al cabo de 60 días). Las curvas de trazos 49 representan los resultados cuando se emplea una enzima más estable (la actividad desciende a cero al cabo de 100 días). Las curvas de trazos 50 representan los resultados cuando se emplea una enzima menos estable (la actividad desciende a cero al cabo de 40 días).

15 Puede verse que a medida que aumenta el ciclo de funcionamiento, la utilización relativa de la enzima disminuye, y aumenta la altura de columna relativa de la enzima. Las condiciones típicas de funcionamiento pueden verse directamente en la Figura 2. Si se usa, por ejemplo, una enzima de estabilidad media y un tiempo de ciclo de funcionamiento de 40 días, la altura de columna relativa de la enzima es 1,02, y la utilización relativa de la enzima es de 0,51. Si se emplea la enzima menos estable en el mismo tiempo de ciclo, la altura de columna relativa de enzima es de 20 1,33, y la utilización relativa de la enzima es de 0,67. Si se emplea la enzima más estable en el mismo tiempo de ciclo, la altura de columna relativa de la enzima es de 0,77 y la utilización relativa de la enzima es de 0,39.

La figura 2 puede usarse también para determinar ajustes en el tiempo de ciclo de funcionamiento y la altura 30

1 de columna relativa de la enzima en las nuevas condiciones
de equilibrio requeridas por las variaciones de la estabili-
dad de la enzima de un lote a otro, para mantener un caudal
constante, unas condiciones constantes de reacción, y caracte-
5 rísticas constantes de velocidad de producción. Estos -
ajustes se dividen preferiblemente en dos categorías. En pri-
mer lugar, el tiempo de ciclo puede mantenerse constante, y
puede variarse la altura de columna relativa de la enzima en
las nuevas condiciones de equilibrio. En segundo lugar, pue-
10 de mantenerse constante la altura de columna relativa de la
enzima, y puede variarse el tiempo de ciclo. También se su-
pone, sólo con fines ilustrativos, que las curvas 49 y 50
representan los límites exteriores de la estabilidad de la
enzima.

15 En uno de los casos, por ejemplo, se supone que
el tiempo de un ciclo de funcionamiento se mantiene cons-
tante usando la forma de aparato de la Figura 1. Si la en-
zima de nueva aportación que se está añadiendo al reactor
11 (Fig. 1(a)) es, por ejemplo, menos estable que la enzima
20 que ya está presente en el reactor 10, la velocidad de adi-
ción de enzima al reactor 11 tiene que aumentarse, y el ni-
vel de material de enzima 47 presente en el reactor 11 al fi-
nal del ciclo de funcionamiento (Fig. 1(b)) será más alto
que el que hay en el reactor 10. Esto se debe al hecho de
25 que se necesita añadir un mayor volumen de enzima menos es-
table al reactor 11 en el mismo tiempo de ciclo de funciona-
miento para lograr la misma actividad de enzima al final de
cada ciclo. Si la enzima de nueva aportación que se está
añadiendo al reactor 12 (Fig. 1(c)) tiene la misma inferior
30 estabilidad que la enzima añadida al reactor 11, el nivel

1 de material de enzima 47 presente en el reactor 12 al final
del ciclo de funcionamiento (Fig. 1(d)) será al menos tan
alto como en el reactor 11, y puede ser un poco más alto.
Si la enzima de nueva aportación que se añade al reactor 10
5 (Fig. 1(e)) tiene la misma estabilidad que la añadida al -
reactor 12, el nivel de material de enzima presente en el
reactor 10 al final del ciclo de funcionamiento (Fig. 1(f))
será sustancialmente igual que en el reactor 12. Siempre
que la estabilidad de la enzima se mantenga constante, las
10 condiciones de equilibrio en los reactores se conseguirán
al cabo de varios ciclos de funcionamiento. Cualquier cam-
bio en la estabilidad de la enzima de nueva aportación que
se está añadiendo da como resultado nuevas condiciones de
equilibrio al cabo de varios ciclos de funcionamiento adi-
15 cionales. Si la enzima de nueva aportación que se está añ-
diendo es más estable que la anteriormente usada, la veloci-
dad de adición de enzima se disminuirá, y la proporción de
enzima presente en los reactores se disminuirá, por las mis-
mas razones dadas antes. El nivel de enzima se reducirá -
20 cuando entra en la serie cada nuevo reactor, hasta que se al-
cancennuevas condiciones de equilibrio.

La Figura 2 muestra relaciones de equilibrio
entre el tiempo de ciclo y la altura de la columna de enzi-
ma. Si ha de mantenerse un ciclo de funcionamiento de 40 -
25 días, por ejemplo, puede verse en la Figura 2 que los reac-
tores han de diseñarse de modo que sean capaces de trabajar
con una enzima menos estable a una altura de columna relati-
va de enzima de 1,33. En promedio, usando una enzima de es-
tabilidad media, la columna de enzima estará trabajando a
30 un valor relativo de 1,02, o sea el 77 por ciento de la máxi

1 ma altura de trabajo de diseño. Si se emplea una enzima
más estable, la altura de columna relativa de enzima sólo
necesita ser de 0,77, o sea el 58 por ciento de la altura
máxima de diseño. Ha de entenderse que durante condiciones
5 transitorias o de no equilibrio, la altura de columna rela-
tiva está en niveles intermedios entre el máximo y el míni-
mo.

En otro de los casos, se supone que la altura
de columna de enzima permanece constante. Para un ciclo de
10 40 días, por ejemplo, una estabilidad media de enzima requere-
rá una altura de columna relativa de la enzima de 1,02. Si
se usa una enzima menos estable con esta misma altura de co-
lumna, el tiempo de ciclo tiene que ser de sólo 30 días. Si
se emplea una enzima más estable con esta misma altura de
15 columna, el tiempo de ciclo puede prolongarse hasta incluso
60 días.

Se entiende también que tanto el tiempo del ci
clo como la profundidad relativa del lecho de encima pueden
variarse según cualquier combinación que se desee para alcan-
20 zar las nuevas condiciones de equilibrio necesarias causadas
por las variaciones en la estabilidad de la enzima.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra las canti-
dades de enzima de estabilidad de actividad media, en canti-
dades de una altura de columna de enzima estándar que se re-
25 quiere añadir por día al reactor que contiene menos enzima
que los demás reactores, para mantener constante sustancial-
mente la actividad total global de enzima de los reactores
de la serie. Hay una curva distinta para cada tiempo de ci
clo diferente.

30 Como se ha dicho anteriormente, cuando el reac-

1 tor separado de la serie para vaciarlo contiene material de
enzima que tiene una actividad residual de enzima, el reac-
tor recién añadido ha de contener una cantidad de material
de enzima de nueva aportación que tiene una actividad sus-
5 tancialmente igual a tal actividad residual que se retira.
Suponiendo el uso de una enzima de estabilidad de actividad
residual que mantiene una plena actividad durante 20 días,
tras lo cual su actividad disminuye a alrededor de cero a
los 60 días, la tabla siguiente indica la cantidad de tal
10 enzima de nueva aportación, en términos de altura de colum-
na relativa de enzima, que el reactor recién añadido debe
contener al comienzo de un ciclo de funcionamiento dado pa-
ra compensar la actividad enzimática residual del reactor
que se está vaciando. La cantidad de enzima inicialmente
15 presente en el reactor que no está lleno depende, pues, de
la duración del ciclo de funcionamiento.

TABLA

<u>Tiempo de ciclo, días</u>	<u>Altura de columna relativa</u>	
20	0,38	
20	30	0,26
	40	0,13
	50	0,03
	60	0,0
	70	0,0

25 Usando los datos de la Tabla anterior y de la Fi-
gura 3 para un tiempo de ciclo de 20 días, por ejemplo, el
reactor recién añadido ha de empezar con una altura de co-
lumna relativa de 0,38 de lecho de enzima de nueva aporta-
ción, y durante un período de 20 días se añade, por incre-
30 mentos, un total de altura de columna relativa de 0,25, para

1 obtener una altura de columna relativa final de enzima de
0,63. Este es el mismo valor de la altura de columna de
enzima dado en la Figura 2 para un ciclo de 20 días usando
una enzima de estabilidad media. La altura de columna fi-
5 nal de enzima del reactor recién añadido al final del ci-
clo es, pues, la misma que la altura de los demás reactores
de la serie al comienzo del ciclo.

Ha de advertirse que todos los datos anteriores
concernientes a la altura de columna de enzima son relati-
10 vos a la supuesta columna unidad de funcionamiento estándar,
en la que se usa una sólo columna de 100 por ciento
de actividad de una enzima específica de estabilidad media,
en un sólo paso, para obtener las características de produc-
to deseadas. Para determinar los valores específicos de
15 un sistema dado de enzimas, es necesario determinar experi-
mentalmente las condiciones de trabajo para llegar a la al-
tura de columna real particular de enzima necesaria para
obtener el producto deseado sin reducción de la actividad
de la enzima. Esta se transforma en la columna estándar
20 que tiene una altura de columna relativa de enzima de 1,0.
Las variaciones en el tiempo de ciclo y la altura real de
la columna de enzima para conseguir resultados similares
puede determinarse usando las Figuras 2 y 3 y la Tabla an-
terior, o unas figuras y tabla similares determinadas experi-
25 mentalmente para tal enzima dada.

La anterior descripción se ha referido a un pro-
cedimiento en que se usan dos reactores en serie. Está com-
prendido en el objeto de esta invención el uso de tres o
más reactores en serie, efectuándose siempre las adiciones
30 de enzima al reactor de la serie que inicialmente contiene

1 menos material de enzima que los demás reactores de la mis-
ma serie. En la mayoría de las condiciones hay una disminu-
ción de la utilización relativa de la enzima cuando se au-
menta el número de columnas de enzima. Aunque el volumen
5 real de enzima de cada columna disminuye a medida que aumen-
ta el número de columnas, el volumen total de enzima en to-
das las columnas en conjunto aumentará. La mayor diferencia
en la utilización de enzima y el volumen de enzima por co-
lumna se da a los tiempos de ciclo cortos, tales como 10 a
10 20 días. Las diferencias se hacen menores al aumentar el
tiempo de ciclo a 40 días o más.

En la Figura 1, la trayectoria a través de los
reactores es en dirección hacia abajo. Esta trayectoria
tiene la desventaja de que hay un lapso de tiempo, que de-
pende de la cantidad de enzima en el reactor que contiene
15 menos material de enzima que los demás reactores, entre el
momento en que se añade enzima de nueva aportación y el mo-
mento en que se observa un cambio en las características
del producto. Un procedimiento alternativo es hacer que la
20 trayectoria a través de los reactores sea en dirección hacia
arriba. Esto puede efectuarse por ajuste apropiado de las
válvulas. Como la enzima se añade en la parte superior del
lecho de enzima, no hay sustancialmente ningún lapso de tiem-
po entre la adición de enzima y cualquier cambio que se de-
25 see en las características del producto. Así se simplifica
el control del proceso.

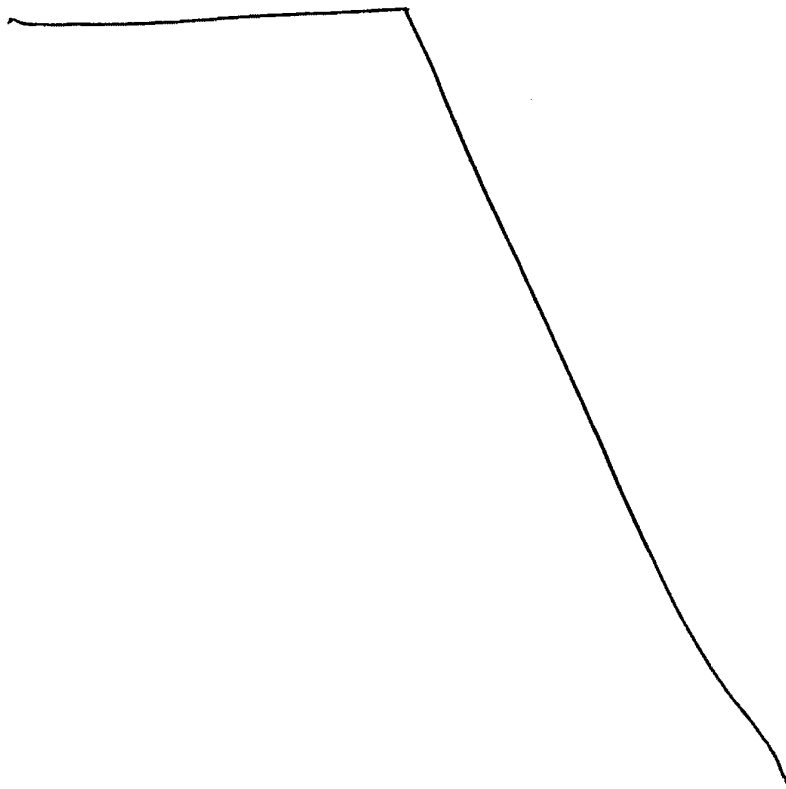
Aunque la descripción anterior se ha referido
al uso de glucosa-isomerasa para convertir glucosa en fruc-
tosa, se entiende que estos principios del proceso son apli-
30 cables al uso de otras enzimas inmovilizadas para efectuar

1 cualquier otra conversión.

5 La trayectoria a través de los reactores conectados en serie mostrada en la Figura 1 pasaba primero a través de un reactor que contenía la altura deseada del lecho de enzima, y después a través de un reactor que contenía menos material de enzima. Se entiende que para algunos sistemas de enzimas, puede ser deseable disponer una trayectoria inversa, en la que el material de partida atraviesa primero un reactor que contiene la menor cantidad de material de enzima, y después los reactores que contienen la altura deseada del lecho de enzima. En sistemas que tienen tres o más reactores de enzima conectados en serie, el reactor que contiene la menor cantidad de material de enzima podría estar incluso en una posición intermedia en la trayectoria en serie.

10

15



1

REIVINDICACIONES

5

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:

10

..

15

20

1ª.- Un procedimiento para llevar a cabo reacciones enzimáticas, tal como la conversión enzimática de glucosa en fructosa, que comprende hacer pasar un material de partida a través de al menos dos reactores conectados en serie, conteniendo dichos reactores conjuntamente material de enzima que da una actividad enzimática total suficiente para dar la composición de producto deseada a un caudal predeterminado y en condiciones de reacción predeterminadas, y después mantener la actividad enzimática global total de los reactores de la serie en un valor sustancialmente constante, a pesar de la reducción de actividad de dicha enzima con el tiempo, añadiendo periódica o continuamente a uno de los reactores de la serie suficiente material de enzima para compensar dicha reducción en la actividad enzimática.

25

30

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que uno de los reactores de la serie contiene inicialmente sustancialmente menos material de enzima que los demás reactores de la serie, y el material enzimático se añade a este reactor para compensar dicha actividad enzimática decreciente.

1 tancialmente constante, y la duración del ciclo de funciona-
miento se ajusta para compensar las variaciones en la esta-
bilidad de la enzima.

5 8ª.- Un procedimiento según la reivindicación
1ª, en el que el material de partida fluye hacia abajo a tra-
vés de los reactores de la serie.

9ª.- Un procedimiento según la reivindicación
1ª, en el que el material de partida fluye hacia arriba a
través de los reactores de la serie.

10 10ª.- Un procedimiento según la reivindicación
1ª, en el que se convierte enzimáticamente una disolución
que contiene glucosa en una disolución que contiene fructosa,
y que comprende hacer pasar una disolución que contiene glu-
cosa a través de al menos dos reactores conectados en serie,
15 conteniendo dichos reactores conjuntamente material de glu-
cosa-isomerasa que da una actividad total de glucosa-isome-
rasa suficiente para dar la composición de producto deseada
que contiene la fructosa a un caudal predeterminado y en con-
diciones de reacción predeterminadas, y después mantener la
20 actividad global total de isomerasa de glucosa de los reacto-
res de la serie en un valor sustancialmente constante, a pe-
sar de la reducción de actividad de dicha glucosa-isomerasa
con el tiempo, añadiendo periódica o continuamente, a uno de
los reactores de la serie, suficiente material de glucosa-iso-
25 merasa para compensar dicha reducción en la actividad de la
enzima.



30 11ª.- Un procedimiento según la reivindicación
10ª, en el que uno de los reactores de la serie contiene ini-
cialmente sustancialmente menos material de glucosa-isomera-
sa que los demás reactores de la serie, y el material de glu-

1 cosa-isomerasa se añade a este reactor para compensar dicha
actividad enzimática decreciente.

5 12ª.- Un procedimiento según la reivindicación
11ª, que tiene un ciclo de funcionamiento que, en condicio-
nes de equilibrio, comienza cuando se empieza el paso de la
disolución que contiene glucosa a la serie de reactores, y
que termina cuando dicho reactor que contiene inicialmente
menos glucosa-isomerasa sustancialmente, contiene sustancial-
mente la misma cantidad de material de glucosa-isomerasa que
10 los demás reactores citados de la serie.

15 13ª.- Un procedimiento según la reivindicación
12ª, en el que, al final de un ciclo de funcionamiento, el
reactor que contiene la actividad de enzima más agotada se
retira de la serie, y se añade a ésta un reactor que contie-
ne sustancialmente menos material de glucosa-isomerasa, al
que se hacen adiciones de glucosa-isomerasa en un nuevo ciclo
de funcionamiento.

20 14ª.- Un procedimiento según la reivindicación
12ª, en el que la cantidad de material de glucosa-isomerasa
inicialmente presente en dicho reactor que contiene sustan-
cialmente menos material de glucosa-isomerasa que los demás
reactores al comienzo de un ciclo de funcionamiento, depende
de la duración de dicho ciclo de funcionamiento.

25 15ª.- Un procedimiento según la reivindicación
12ª, en el que la duración del ciclo de funcionamiento se
mantiene sustancialmente constante, y la profundidad del le-
cho de material de glucosa-isomerasa en los reactores se
ajusta a las nuevas condiciones de equilibrio para compensar
las variaciones en la estabilidad de la glucosa-isomerasa.

30 16ª.- Un procedimiento según la reivindicación

1 12ª, en el que la profundidad del lecho de material de glu-
cosa-isomerasa en los reactores de la serie distintos del
reactor que inicialmente contiene menos material de glucosa-
isomerasa se mantiene sustancialmente constante, y la du-
5 ración del ciclo de funcionamiento se ajusta para compensar
las variaciones en la estabilidad de la glucosa-isomerasa.

17ª.- Un procedimiento según la reivindicación
10ª, en el que la disolución que contiene glucosa fluye ha-
cia abajo a través de los reactores de la serie.

10 18ª.- Un procedimiento según la reivindica-
ción 10ª, en el que la disolución que contiene glucosa fluye
hacia arriba a través de los reactores de la serie.

19ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LLEVAR A CABO
REACCIONES ENZIMATICAS.

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que
antecede, representado en los dibujos que se acompañan y pa-
ra los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinticuatro hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

MADRID, 13. ABR. 1979

P.A.

Fernando de Elizaburu
Por Poderes



11048

CGD.

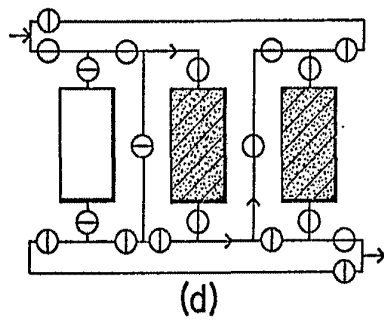
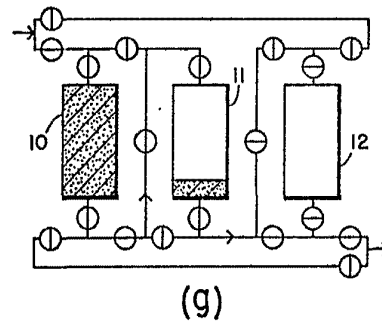
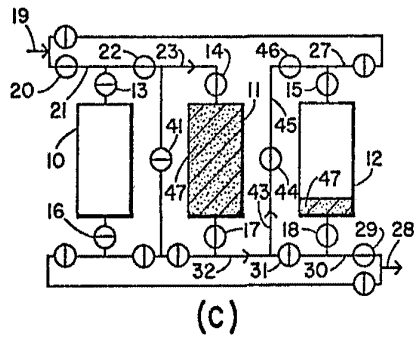
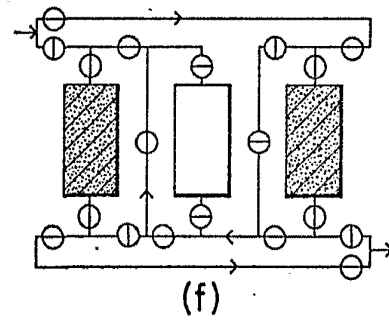
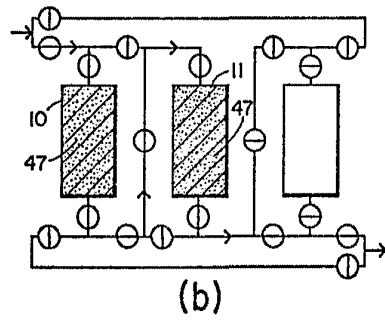
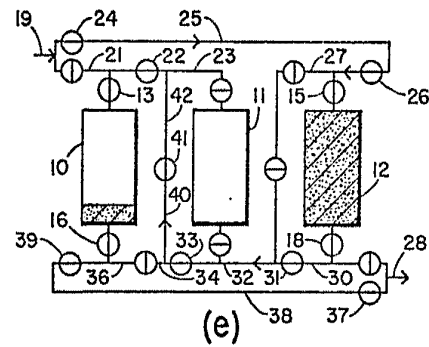
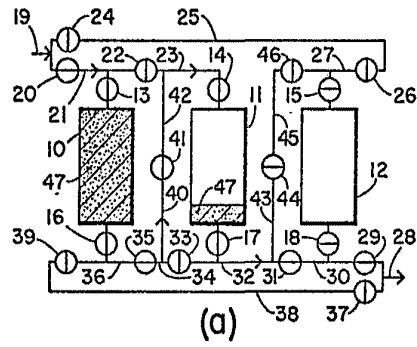


FIG. 1

Fernando de Elizaburu
 Por Poder.

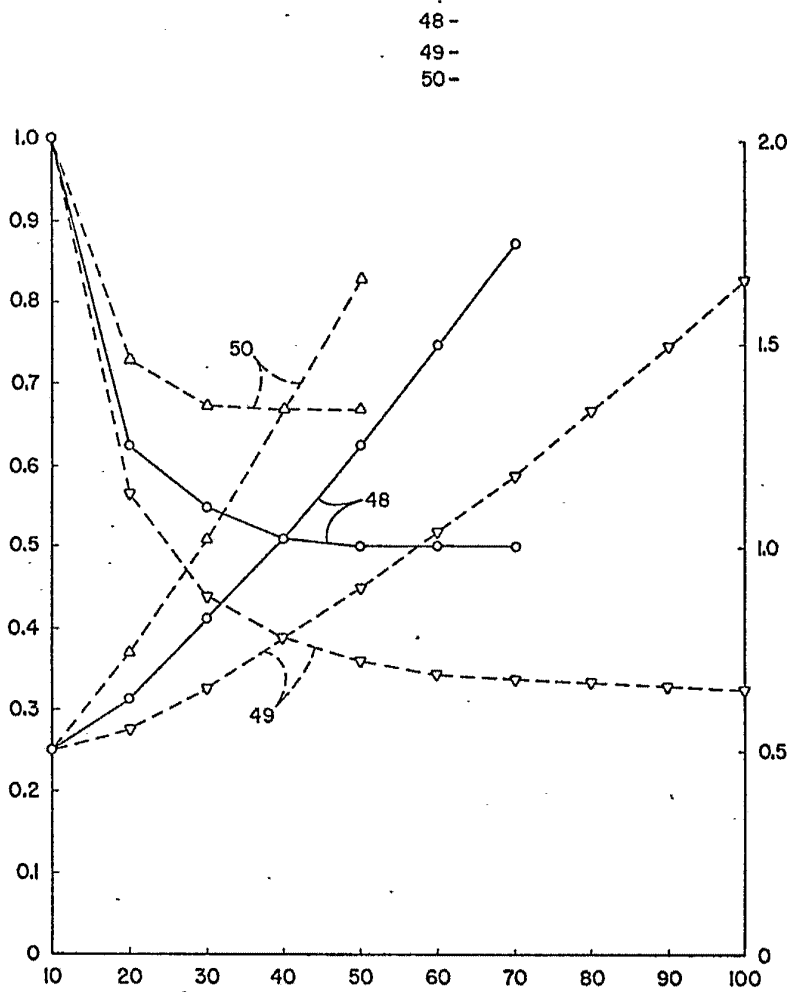


FIG. 2

Fernando de Elizaburu
Por Poder

