



ESPAÑA

19 ES

11 NÚMERO	470.766
22 FECHA DE PRESENTACION	14.6.78

10 A1

PATENTE DE INVENCION

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

30 PRIORIDADES: 31 NÚMERO	32 FECHA	33 PAIS
807.289	16.6.77	EE.UU.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO PARA PRODUCIR UN JARABE RICO EN FRUCTOSA A PARTIR DE SACAROSA"

71 SOLICITANTE (S)
CPC INTERNATIONAL, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
International Plaza, Englewood Cliffs, Nueva Jersey 07632, Estados Unidos de América

72 INVENTOR (ES)
Robert E. Heady

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 69.224)

1

CAMPO DE LA INVENCION

5

10

15

Esta invención se refiere generalmente a la transfructosilación de la sacarosa. Más particularmente, esta invención se refiere a un procedimiento único para la producción de fructosa a partir de sacarosa por la vía de un substrato que contiene un polímero de fructosa. Este procedimiento proporciona un nuevo método enzimático para la producción de jarabes ricos en fructosa que tienen un contenido de fructosa notablemente más alto que el que puede obtenerse actualmente por isomerización de glucosa de hidrolizados de almidón, sin la necesidad de separación física del producto final de fructosa resultante. Este procedimiento es particularmente adaptable a la producción de jarabes de fructosa que contienen más de 55% de fructosa y proporciones superiores. La invención proporciona también una nueva enzima de transfructosilasa a partir de cultivos de la levadura, Pullularia pullulans, que se ha encontrado útil en tal producción.

20

25

Esta invención da lugar a cierto número de productos. Estos incluyen la fructosa final o un jarabe rico en fructosa, así como diversos productos intermedios tales como el polímero de fructosa, substrato inicial que contiene polímero de fructosa (o polisacárido), substrato del que se ha separado el polímero, y substrato (con o sin el polímero) después de la isomerización. Cada uno de estos productos es directamente útil por sus peculiares propiedades.

30

Cada uno de estos productos tiene las propiedades de los azúcares y jarabes convencionales y puede emplearse en sus aplicaciones habituales. Estas incluyen, por ejemplo, el uso como agentes edulcorantes de alimentos y como

1 -materias primas para la preparación de productos farmacéu-
ticos. Adicionalmente, estos productos se pueden emplear
en las aplicaciones industriales comunes para azúcares y
jarabes. Así, aquéllos pueden utilizarse en la producción
5 de adhesivos, humectantes, papel pergamino, agentes curtien-
tes, aislantes eléctricos, aglutinantes de machos de fun-
diciones, insecticidas, tintes y similares o, más general-
mente, como plastificantes, agentes espesantes, etc. En re-
sumen, aquéllos son útiles en todo el amplio espectro de
10 aplicaciones en las que se han empleado ya productos análo-
gos.

DEFINICIONES

Debido a los muchos términos que son de uso común
en la técnica, las definiciones que siguen se proporcionan
15 para definir el significado de estos términos tal como se
emplean en la presente invención.

Glucosa y Dextrosa

Los términos "glucosa" y "dextrosa" se emplean
intercambiabilmente en esta solicitud de Patente para abar-
20 car este monosacárido en cualquier forma, sea de solución
o seca.

Sacarosa

El término "sacarosa" se refiere a este disacári-
do en forma refinada o bruta, en solución o seca, a partir
25 de cualquier fuente de materia prima de sacarosa, por ej.
caña de azúcar o remolacha azucarera. En la práctica de es-
ta invención, el material de partida de sacarosa se emplea
típicamente en medio acuoso.

Fructosa y Levulosa

Los términos "fructosa y levulosa se emplean por

1 -regla general intercambiamente en la técnica para refe-
rirse al isómero de la dextrosa que es más dulce que la
dextrosa. La fructosa se encuentra en la miel y en el azú-
car invertido, junto con dextrosa, y es valiosa debido a
5 su dulzor. Los términos levulosa y fructosa se utilizarán
intercambiamente en esta memoria descriptiva para hacer
referencia a este monosacárido en cualquier forma, de solu-
ción o seca.

Preparación de Enzima

10 El término "preparación de enzima" se utiliza en
esta memoria para hacer referencia a cualquier composición
de materia que exhiba la actividad enzimática deseada. El
término se emplea para hacer referencia, por ejemplo, a
células vivas enteras, células secas, extractos celulares,
15 preparaciones refinadas y concentradas derivadas de las cé-
lulas y de líquidos de cultivo. Las preparaciones de enzi-
ma pueden utilizarse bien sea como solución o en una forma
inmovilizada, en la práctica de esta invención.

Enzima Isomerasa

20 Se hace referencia en esta memoria a cualquier
preparación de enzima que isomericice la dextrosa a levulosa
como "enzima isomerasa". Estas enzimas son bien conocidas
en la técnica y se ha hecho referencia a ellas como dextro-
sa-isomerasa, xilosa-isomerasa y glucosa-isomerasa. Tales
25 enzimas pueden derivarse de una diversidad de microorganis-
mos adecuados. Ejemplos de tales microorganismos incluyen
los de los géneros Streptomyces, Bacillus, Arthrobacter,
Actinoplanes, Curtobacterium y otros.

30 Una enzima isomerasa preferida útil en la prácti-
ca de la presente invención se deriva de Streptomyces oli-

1 vochromogenes ATCC Nº 21.713, ATCC Nº 21.714 ó ATCC Nº
21.715 (el último de los cuales es un producto aislado de
una colonia simple de ATCC Nº 21.713) como se describe en
la Patente de EE.UU. 3.813.318 y en la Patente de los EE.UU.
5 3.957.587, particularmente cuando se prepara por el proce-
dimiento descrito en la Patente de EE.UU. 3.770.589 o la
Patente de EE.UU. 3.813.318.

10 Recientemente, la técnica ha llegado a aceptar
procedimientos en los que la enzima isomerasa se inmovili-
za sobre un vehículo inerte insoluble en agua. La enzima
inmovilizada es adecuada después para uso en una conversión
continua de glucosa en un jarabe más rico en fructosa. Ejem-
plos de tales procedimientos se describen en las Patentes
de EE.UU. 3.708.397; 3.788.945; 3.850.751; 3.868.304; la
15 Patente de Bélgica 819.859; y la Patente de los EE.UU.
3.960.633 (Patente de Bélgica Nº 810.480).

Unidad de Isomerasa

La "unidad de isomerasa" se define como la canti-
dad de actividad enzimática que se requiere para producir
20 un micromol de levulosa por minuto en las condiciones de
isomerización descritas más adelante en esta Memoria bajo
el encabezamiento "Ensayo de la Actividad de Isomerasa".

Ensayo de la Actividad de Isomerasa

25 Tal como se utiliza en esta memoria, este térmi-
no se refiere al procedimiento de ensayo que implica rea-
lizar una determinación espectrofotométrica de la cetosa
producida a partir de una solución de glucosa en una serie
de condiciones normalizadas.

Se prepara una solución concentrada de la mane-
ra siguiente:

30

27068

1

SOLUCION CONCENTRADA PARA EL ENSAYO

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 M	1 ml
CoCl ₂ ·6H ₂ O 0,001 M	1 ml
Tampón de fosfato de sodio 1 M, de pH 7,5	0,5 ml
D-glucosa anhidra	1,44 g
Adición suficiente de agua destilada para completar un volumen total de 7,5 ml.	

10

La preparación de enzima a ensayar se diluye primeramente de tal modo que contenga de 1 a 6 unidades de isomerasa por ml.

15

Se lleva a cabo una isomerización enzimática por adición de 1 ml de la preparación de enzima a 3 ml de la solución concentrada, e incubando durante 30 minutos a 60°C. Al final del período de incubación, se toma una parte alícuota y se enfría bruscamente en un volumen de 9 ml de ácido perclórico 0,5 N. La parte alícuota enfriada bruscamente se diluye luego a un volumen total de 250 ml. Como testigo, para fines de comparación, se realiza también una prueba en blanco con glucosa empleando 1 ml de agua en sustitución de la cantidad de 1 ml de la preparación de enzima en solución al comienzo del período de incubación.

20

25

Se determina luego la cetosa por un método de cisteína-ácido sulfúrico. Para los fines de este ensayo, se define una unidad de isomerasa como la cantidad de actividad de enzima que se requiere para producir un micromol de levulosa por minuto en las condiciones de isomerización descritas.

30

1

Transfructosilación

Tal como se utiliza en esta memoria, este término se refiere a la transferencia de un resto de fructosilo desde un donante, p. ej., sacarosa, a un aceptor, p. ej., polisacárido.

5

Enzima de Fructosil-transferasa

Como se utiliza en esta memoria, este término se refiere a cualquier enzima que catalice la transfructosilación e incluye la preparación de enzima derivada de Pullularia pullulans ATCC 9348 (sinónimo de Aureobasidium pullulans).

10

Unidad de Fructosil-transferasa

Tal como se utiliza en esta memoria, una unidad de fructosil-transferasa se define como la cantidad de actividad enzimática requerida para producir un micromol de azúcar reductor, calculado como glucosa, por minuto en las condiciones siguientes: (a) pH 5,5, (b) temperatura 55°C, y (c) concentración del sustrato, 60 g de sacarosa de calidad para alimentación por 100 ml de una mezcla de reacción acuosa.

15

20

Las determinaciones de azúcar reductor (calculado como glucosa) se realizan utilizando un "Autoanalizador Technicon II" (Technicon, Inc., Tarrytown, Nueva York). El análisis se realiza por un método convencional con ferricianuro alcalino, Analytical Biochemistry 45, Nº 2, págs. 517-524 (1972), adaptado para uso en el "Autoanalizador II". A no ser que se indique otra cosa, las determinaciones de la actividad enzimática se realizan por comprobación continua de una mezcla de reacción constituida por los componentes siguientes:

25

30

1 7,5 ml de solución acuosa de sacarosa de calidad para alimentación al 80% (peso/volumen);

2,3 ml de tampón de citrato 0,1 M de pH 5,5;

5 0,2 ml de muestra de enzima que contiene la cantidad de enzima de fructosil-transferasa que producirá de 5 a 25 microgramos de azúcar reductor (calculado como glucosa) por minuto y por ml de mezcla de reacción.

Substrato Primario

10 El término "substrato primario", tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a aquéllos sacáridos que se hallan en forma adecuada para y que tienen un resto fructosilo disponible para participación en la transfructosilación, como por ejemplo soluciones acuosas de sacarosa.

Substrato Secundario

15 El término "substrato secundario" tal como se utiliza en esta memoria, es el producto de reacción resultante de someter el substrato primario a la acción de una preparación de enzima de fructosil-transferasa, como se define en esta memoria.

Partes y Porcentajes

20 En esta solicitud de Patente, todas las partes son en peso y todos los porcentajes son en peso por volumen (peso/volumen) a no ser que se establezca expresamente otra cosa.

Ensayo de Cromatografía Líquida a Alta Presión

25 Tal como se utiliza en esta memoria, este término define el procedimiento por el cual se analizan los jarabes de la invención utilizando cromatografía líquida a alta presión de acuerdo con la técnica siguiente. Los componentes se cromatografían por elución con agua a partir

30

1 de una resina cambiadora de catión en forma cálcica. Los
componentes eluidos se detectan por medio de un refractó-
metro diferencial. Los hidratos de carbono distintos de
la dextrosa se cuantifican utilizando un integrador elec-
5 trónico, y se obtiene la dextrosa por diferencia. El pro-
cedimiento general es el dado en "Análisis de Mezclas de
Hidratos de Carbono por Cromatografía Líquida", Am. Soc.
Brew. Chem. Proc., 1973, págs. 43-46. La resina utilizada
es "Aminex Q" 15-5 en forma cálcica, Bio-Rad Laboratories,
10 Richmond, California.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la invención, se proporciona un
procedimiento para la producción de jarabes que comprende
someter un substrato primario, p. ej., sacarosa, a la
15 acción de una preparación de enzima de fructosil-transfe-
rasa capaz de convertir la sacarosa en un producto que
comprende una fracción de monosacárido que contiene una
cantidad principal de glucosa y una cantidad menor de fruc-
tosa, y polisacáridos que contienen al menos 66% (en peso)
de restos fructosilo. Tal producto comprende un substrato
20 secundario de esta invención. Estos polisacáridos del subs-
trato secundario incluyen todos los polímeros que contienen
fructosa (distintos de la sacarosa) que tienen dos o más
restos de monosacáridos. Estos polímeros pueden caracteri-
zarse además por incluir polisacáridos que contienen res-
25 tos fructosilo unidos por enlaces beta (2 → 1). Como se
describe más adelante en esta memoria, los polisacáridos
resultantes de condiciones dadas de transfructosilación
pueden estar comprendidos predominantemente dentro de una
30 gama predeterminada. Así, por ejemplo, puede producirse un

1 — substrato secundario en el que la mayoría (p. ej., como
 mínimo el 60% en relación molar) de los polisacáridos son
 oligómeros que tienen de 2 a 10 (esto es, DP 2-10), más
5 normalmente de 3 a 6 (esto es, DP 3-6) restos de monosa-
 cáridos. Después de ello, dicha glucosa se isomeriza (por
 la vía de la acción de enzima isomerasa) a fructosa en
 presencia de dichos polisacáridos, seguido por hidrólisis
 de dichos polisacáridos en ausencia de enzima isomerasa
 activa. La hidrólisis puede llevarse a cabo enzimática-
10 mente utilizando invertasa o por hidrólisis ácida en condicio-
 nes suaves.

 En una realización adicional de la invención,
 los polisacáridos pueden separarse de dicha glucosa y di-
 cha fructosa, y después de ello hidrolizarse, como se ha
15 descrito previamente, para producir un jarabe ultra-rico
 en fructosa, p. ej. que tenga un contenido de fructosa
 mayor que 66% en peso y mayor preferiblemente que 90% en
 peso, directamente a partir del substrato secundario de
 esta invención sin necesidad de isomerización de la dex-
20 trosa contenida en dicho substrato. Tal separación se pue-
 de realizar convenientemente por técnicas de separación
 física convencionales basadas en el tamaño de las molécu-
 las, como por ejemplo, la tecnología de membranas conven-
 cionales (p. ej. ultrafiltración, diálisis), precipitación
25 con disolventes, adsorción con carbono y análogas. Como
 ejemplos de tal tecnología de membranas se pueden citar
 las Patentes de EE.UU. 3.173.867; Re 26097; 3.541.006; y
 3.691.068.

 Una realización preferida es un procedimiento
30 para la producción de jarabes ricos en fructosa que com-

1 -prende someter la sacarosa a la acción de una preparación
de enzima fructosil-transferasa, como por ejemplo la deri-
vada de Pullularia pullulans tal como ATCC 9348; ATCC
12535; NRRL 1673; NRRL Y2311; NRRL YB3892; NRRL YB 3861,
5 NRRL 3987 y ATCC 15223. El producto resultante, o substra-
to secundario, se somete a la acción de enzima isomerasa.
Después de ello, el producto isomerizado se hidroliza en
ausencia de enzima isomerasa activa.

10 Se cree que el substrato secundario producido
de acuerdo con el procedimiento de esta invención es nuevo.
Este substrato es excepcionalmente adecuado para isomeri-
zación y subsiguiente hidrólisis a fin de proporcionar un
jarabe que contiene más de 55% de fructosa, y se produce
sometiendo la sacarosa a la acción de una preparación de
15 enzima fructosil-transferasa. Por consiguiente, otra rea-
lización de esta invención son substratos adecuados para
isomerización enzimática e hidrólisis subsiguiente a jara-
bes que contienen más de 55% de jarabe de fructosa, que
comprenden (1) desde aproximadamente 20% a aproximadamente
20 60% en peso de monosacáridos, que contienen una cantidad
principal de glucosa y una cantidad menor de fructosa, y
(2) desde aproximadamente 70% a aproximadamente 40% de
polisacáridos que contienen más de 66% en peso de restos
fructosilo.

25 Son especialmente preferidos los substratos se-
cundarios derivados de sacarosa por transfructosilación
en presencia de una cantidad efectiva de una preparación
de enzima fructosil-transferasa derivada de una cepa de
Pullularia pullulans ATCC 9348, a una temperatura que va
30 desde aproximadamente 25°C a aproximadamente 65°C, y pre-

1 —feriblemente desde aproximadamente 50°C a aproximadamente
60°C, y a un pH que va desde aproximadamente 4,5 a apro-
ximadamente 6,5, y preferiblemente de aproximadamente 5,4
5 a aproximadamente 5,6. Las concentraciones de sacarosa de
partida empleadas pueden comprender desde valores tan ba-
jos como 10 g por 100 ml de agua. Sin embargo, se prefie-
re emplear una concentración de sustancia seca tan alta
como sea posible, comprendiendo preferiblemente desde
aproximadamente 30 g a aproximadamente 60 g por 100 ml
10 (para una velocidad de reacción máxima), hasta el punto
de saturación de la sacarosa (y mayores, como se describe
con mayor detalle más adelante en esta memoria).

Se puede emplear un mínimo de 0,5 unidades de
fructosil-transferasa por gramo de sacarosa para producir
15 el nuevo sustrato de esta invención. Generalmente, la
cantidad de enzima utilizada no excederá de 50 unidades
por gramo de sacarosa debido a consideraciones económicas.
Especialmente preferido para obtener el sustrato secun-
dario deseado en un tiempo comercialmente aceptable, y
20 dentro de los parámetros de procedimiento arriba descri-
tos, es un intervalo que va desde aproximadamente 2 a
aproximadamente 30 unidades por gramo de sacarosa.

Lo que antecede y otras realizaciones de esta
invención se describen con mayor detalle más adelante en
25 esta memoria.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El procedimiento para la producción de la nue-
va fructosil-transferasa de la invención puede utilizar
técnicas de fermentación convencionales; p. ej., véanse
30 las Patentes de EE.UU. Núms. 3.565.756; 3.806.419; 3.535.123;

1 S. Ueda y otros, Applied Microbiology, 11, 211-215 (1963).
Preferiblemente se utilizan ciertas nuevas modalidades
de separación o purificación, que se describirán con mayor
detalle más adelante en esta memoria. El ejemplo siguien-
5 te es un procedimiento de fermentación típico para la pro-
ducción de la enzima a partir de Pullularia pullulans
ATCC 9348.

Ejemplo 1

Producción de la Preparación de Enzima Fructosil-Transfe- 10 rasa - Soporte de Celite

A. Procedimiento de fermentación utilizado para producir la enzima

El medio utilizado para el desarrollo del inócu-
lo y la fermentación para producir la enzima es como sigue:

15 0,5% de fosfato de potasio dibásico
0,1% de cloruro de sodio
0,02% de sulfato de magnesio heptahidratado
0,06% de sulfato diamónico
0,3% de extracto de levadura (Laboratorios Difco)
20 7,5% de sacarosa (calidad para alimentación)
pH del medio, ajustado a 6,8.

Los matraces de siembra, Erlenmeyers de 500 ml que contie-
nen 100 ml de medio estéril, se inoculan a partir de un
cultivo en pico de flauta de la levadura negra, Pullularia
25 pullulans. La cepa particular de la levadura empleada se
designa en el catálogo de la Colección Americana de Culti-
vos Tipo (Rockville, Maryland) como ATCC 9348. Los matra-
ces de siembra, después del desarrollo en una máquina al-
ternativa de sacudidas durante 48 horas a 32°C, se utili-
zan para inocular matraces de fermentación Erlenmeyer de
30

1 1 litro, cada uno de los cuales contiene 200 ml del medio
previamente definido. La concentración de inoculante es
0,5% peso/volumen. La fermentación se lleva a cabo en una
máquina alternativa de sacudidas a 32°C durante 7 días.

5 B. Recuperación de la enzima a partir del caldo de fermentación

Los caldos de fermentación procedentes de cua-
renta matraces de 1 litro de la máquina de sacudidas se
juntan, y se enjuagan los matraces con agua, la cual se
añade también al caldo acumulado. El volumen final del cal-
do, después de la dilución es de 12 litros. El volumen ori-
ginal del caldo es aproximadamente 8 litros. Los 12 litros
de caldo de fermentación se someten a una centrifuga con-
tinua Sharples para separar las células de levadura y los
desechos celulares. El sobrenadante, que es una solución
viscosa negra, se dosifica luego con cloruro de calcio a
una concentración de 0,5% peso/volumen y el pH de la solu-
ción resultante se ajusta a 7,0 con hidróxido de sodio.
Se lleva a cabo luego un segundo paso por la centrifuga
Sharples para producir un sobrenadante viscoso que tiene
un color bajo. El pH del sobrenadante decolorado se ajus-
ta a 5,5 con ácido clorhídrico, seguido por dosificación
con 1000 unidades (como se definen en la Patente de los
EE.UU. 3.806.419) de pululanasa. El caldo resultante se
conserva con tolueno (añadido hasta saturación) y se deja
que la pululanasa reaccione a la temperatura ambiente du-
rante la noche. Después de la digestión con pululanasa
durante la noche, una concentración de 1% de Celite No 503
Grefco (Johns-Manville Products Corporation, Lompoc, Cali-
fornia) se añade al caldo formando una suspensión, seguido

1 por la adición de 2 volúmenes (24 litros) de acetona. Se
forma un precipitado que se recoge por filtración, y la
torta de filtración se lava con acetona y se seca a la tem-
peratura ambiente. La torta de filtración recogida contiene
5 la enzima fructosil-transferasa insolubilizada.

En el Ejemplo 1 debe observarse que la adición de
cloruro de calcio al caldo de fermentación, con ajuste del
pH del caldo, da como resultado la separación del pigmento
negro y los polisacáridos ácidos presentes. [Para el estu-
10 dio de estos polisacáridos ácidos, véase Acta Chem. Scand.
16, 615-622 (1962).] El producto de enzima final se obtie-
ne, por consiguiente, en forma de una preparación incolora
relativamente pura. Este procedimiento de refinado constituye
una realización preferida de esta invención y permite que
15 procedimientos simples de refinado, esto es centrifugación,
filtración o precipitación, hagan posible la obtención del
producto final. Así, de acuerdo con esta realización, se
proporciona un procedimiento para la separación de polisa-
cáridos ácidos y subproductos de pigmento negro a partir
20 de los caldos de fermentación finales de la levadura negra,
Pullularia pullulans. Este método permite obtener una pre-
paración final de enzima libre de subproductos indeseables
de pigmento y de polisacáridos ácidos, los cuales se forman
durante el procedimiento de fermentación. Estos subproduc-
25 tos, a no ser que se separen, coprecipitan con la enzima
después de la adición del disolvente al caldo de fermenta-
ción.

Como un refinado adicional para recuperar las pre-
paraciones de enzima purificadas de esta invención, es de-
30 seable separar el polisacárido pululana que está presente

1 inherentemente en el caldo de fermentación, porque aquél
coprecipitará también con la enzima fructosil-transferasa
después de la adición de disolvente al caldo de fermenta-
ción. Por esta razón, el sobrenadante obtenido a partir
5 del tratamiento con cloruro de calcio y el ajuste del pH
se puede tratar además con la enzima hidrolizante bien
conocida, pululanasa. La enzima pululanasa hidroliza rápi-
damente la pululana para producir un polímero de peso mole-
cular inferior, evitando así la coprecipitación y la consi-
10 guiente contaminación de la preparación de la enzima fruc-
tosil-transferasa durante el tratamiento con disolvente
(p. ej. acetona, alcohol y análogos). La purificación de
la enzima fructosil-transferasa deseada de esta manera
constituye otra nueva realización de esta invención.

15 Las preparaciones de la enzima fructosil-trans-
ferasa de esta invención pueden emplearse sin la separación
de la pululana. Así, esta invención se puede llevar a la
práctica sin hidrólisis de la pululana por la pululanasa,
en cuyo caso la pululana sirve como vehículo de la enzima
20 fructosil-transferasa.

El Ejemplo siguiente demuestra el uso de pulula-
na como vehículo.

Ejemplo 2

Producción de Substrato Secundario utilizando Enzima

25 Fructosil-Transferasa sobre Vehículo de Pululana

Una solución de sacarosa al 20% tamponada con
tampón de citrato 0,05 M de pH 5,5 se dosifica con una con-
centración al 1% de pululana seca producida de acuerdo con
el procedimiento del Ejemplo 1, excepto que la pululana no
se hidroliza con pululanasa y, por consiguiente, sirve co-
30

1 —mo vehículo y no se emplea cantidad alguna de Celite. La actividad de fructosil-transferasa es 677 unidades/gramo de pululana. La reacción se lleva a cabo a la temperatura ambiente hasta que la mezcla se vuelve turbia. Una muestra
 5 de este material se analiza por cromatografía líquida a alta presión, con los resultados siguientes:

DISTRIBUCION DE SACARIDOS POR ANALISIS CIAP

Fructosa	Dextrosa	DP ₂	DP ₃	DP ₄₊
6,9	40,6	6,2	11,1	35,2

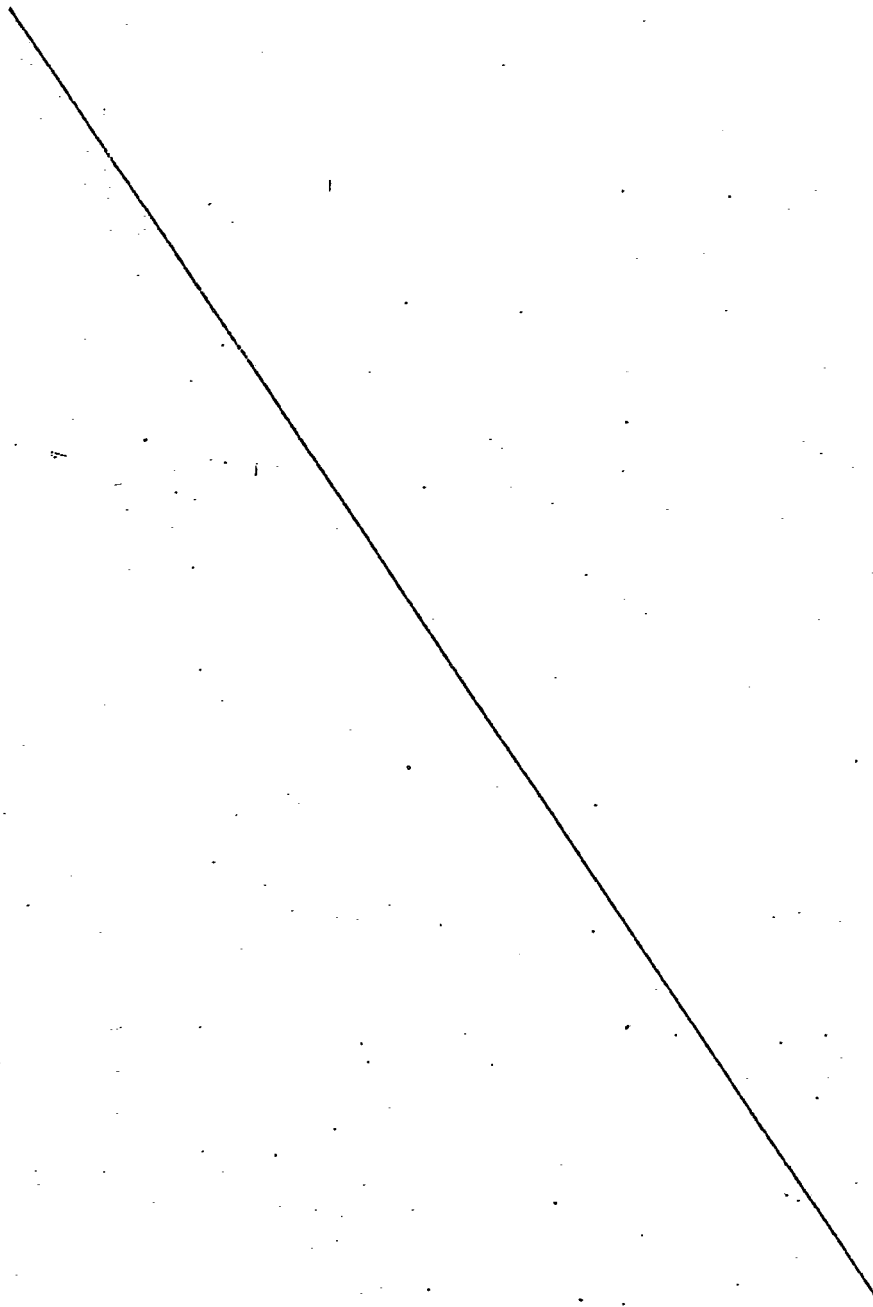
10 Los ejemplos siguientes caracterizan adicionalmente la enzima producida en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Productos de la Acción Enzimática y Estabilidad Térmica de la Enzima

15 A frascos de reacción, equipados con tapones roscados, se añaden 60 g de sacarosa de calidad para alimentación y una preparación de enzima fructosil-transferasa. La preparación de enzima se obtiene a partir del producto de enzima del Ejemplo 1 por dispersión de partes alícuotas del
 20 producto sólido Celite-enzima en cantidades medidas de agua para producir una concentración adecuada de una solución de enzima. La Celite se separa después por filtración. El filtrado se utiliza para dosificar la mezcla de reacción con 10, 20 y 30 unidades de enzima por gramo de substrato
 25 de sacarosa. Estas mezclas se diluyen luego cada una a un volumen final de 100 ml con agua. Las conversiones se realizan durante 66 horas a pH 5,5 y a 55°C ó 60°C, respectivamente. Se toman muestras a las 24, 43 y 66 horas para determinaciones de azúcar reductor a fin de detectar la
 30 presencia de actividad enzimática. Una vez que se han rea-

- 1 lizado sobre las muestras las determinaciones de azúcar reductor, las mezclas de reacción que quedan se congelan para detener la acción enzimática y se toman muestras para la determinación de la composición de hidratos de carbono
- 5 por cromatografía líquida a alta presión. Se obtuvieron los resultados siguientes:



Ensayos de Azúcar Reductor¹

Tempera- tura, °C	Unidades de Enzima ²	24 Horas		43 Horas		66 Horas	
		Azúcar reductor mg/ml.	pH	Azúcar reductor mg/ml.	pH	Azúcar reductor mg/ml.	pH
55°	0	--	5,80	--	5,80	--	--
	10	191	5,40	231	5,25	268	
	20	192	5,40	270	5,25	301	
	30	246	5,35	334	5,15	390	
60°	0	0,7	5,75	1,5	5,80	2,1	
	10	200	5,10	243	4,70	270	
	20	219	5,15	288	4,90	346	
	30	282	5,20	360	4,95	420	

1) El método utilizado se indica en la definición de unidad de fructosil-transferasa.

2) Unidades de enzima por gramo de sacarosa.

COMPOSICION DE HIDRATOS DE CARBONO POR ANALISIS CIAP

Dosis de enzima, unidades/g de glucosa	Tiempo de reac- ción, horas	Temperatura de Reacción, 55°C				DP ₂ (%)	DP ₃ (%)	DP ₄ (%)
		Dextrosa (%)	Levulosa (%)	DP ₂ (%)	DP ₃ (%)			
10	24	31,7	2,3	10,0	25,0	31,0		
	43	34,5	3,2	9,4	17,9	35,0		
	66	36,7	3,9	8,6	15,0	35,8		
20	24	33,9	2,8	8,8	19,7	34,8		
	43	37,4	4,2	7,9	12,1	38,4		
	66	40,5	4,9	7,4	10,8	36,4		
30	24	37,4	4,0	7,1	12,5	39,0		
	43	41,8	5,9	6,8	11,4	34,1		
	66	46,1	7,5	7,0	11,5	27,9		
<u>Temperatura de Reacción, 60°C</u>								
10	24	32,2	2,8	6,1	24,3	30,6		
	43	35,0	4,0	9,8	18,2	33,0		
	66	36,7	5,4	9,4	16,0	32,5		
20	24	35,5	3,8	8,4	17,1	35,2		
	43	38,4	5,0	8,0	12,3	36,3		
	66	41,3	6,6	7,9	11,1	33,1		

TABLA (Continuación)
 Temperatura de Reacción, 60°C

Dosis de enzima, unidades/g de glucosa	Tiempo de reac- ción, horas	Dextrosa (%)	Levulosa (%)	DP ₂ (%)	DP ₃ (%)	DP ₄ ⁺ (%)
30	24	39,0	5,5	7,1	12,1	36,3
	43	43,7	7,1	7,3	11,0	30,9
	66	47,8	9,2	7,4	11,1	24,5

1 El Ejemplo 3 demuestra la estabilidad térmica en presencia de sustrato de la enzima a 55°C y 60°C a lo largo de un período de 66 horas a un pH de 5,5, demostrando así el potencial comercial de la enzima. Además, el sustrato secundario producido por conversión enzimática de la 5 sacarosa con la nueva preparación de fructosil-transferasa de esta invención es, según se demuestra por el análisis de hidratos de carbono, un producto potencialmente valioso adecuado para la producción de jarabes ricos en fructosa a partir de sacarosa, debido a que los constituyentes predominantes son, como se muestra, dextrosa y polímeros que por hidrólisis subsiguiente producen fructosa como el mono- 10 sacárido predominante. Este ejemplo demuestra también que la nueva enzima de la invención es efectiva a una concentración de sacarosa de 60% (peso/volumen). Se demuestra también la funcionalidad de la enzima en presencia de concentraciones altas de glucosa. 15

Ejemplo 4

Efecto de la Temperatura sobre la Actividad de la Enzima

20 El efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción de la enzima fructosil-transferasa se determina utilizando el "Autoanalizador Technicon II" como sigue:

25 La mezcla de reacción se compone de 7,5 ml de solución de sacarosa al 80% (peso/volumen), 2,3 ml de un tampón de citrato 0,1 M a un pH de 5,5, y 0,2 ml de una solución de enzima en pululana al 2% peso/volumen (preparación de enzima del Ejemplo II). La concentración final de sacarosa es 60% (peso/volumen). Las muestras se mantienen a las temperaturas siguientes y se ensayan durante 10 minu- 30

1 - tos en el "Autoanalizador Technicon II". Los resultados
demuestran que a 40°C, la velocidad de la reacción enzi-
mática es 1,89 veces la de 30°C; a 50°C, 1,29 veces ma-
yor que a 40°C, y a 60°C, 1,48 veces mayor que a 50°C.
5 Esto demostró una velocidad de reacción creciente al ele-
varse la temperatura.

Ejemplo 5

Demostración de la Constante de Michaelis-Menten (K_m) de la Enzima Fructosil-Transferasa

10 La K_m de una enzima denota la concentración del
substrato a la cual la velocidad de formación del produc-
to es la mitad de la V_{max} . Se utilizó el procedimiento si-
guiente para obtener el valor K_m de la enzima fructosil-
-transferasa.

15 Utilizando una solución concentrada de sacarosa
al 90% peso/volumen ajustada a pH 5,5 con tampón de citra-
to 0,1 M, se preparan las concentraciones adecuadas de sa-
carosa en partes alícuotas de 9,8 ml para dar: concentra-
ciones al 5, 10, 30, 40, 50, 60 y 70% de sacarosa en un
20 volumen final de 10 ml. Se añade una solución de enzima
en 0,2 ml que contienen 1,1 unidades de enzima fructosil-
-transferasa a las muestras atemperadas. Después de ello,
las muestras se ensayan inmediatamente a 55°C en el "Auto-
analizador Technicon II" como se ha descrito anteriormente
25 (véase unidad de fructosil-transferasa). Se incluye como
testigo un patrón de glucosa (calibrado en $\mu\text{g/ml}$).

A continuación se da la velocidad de formación
de glucosa expresada como $\mu\text{g/ml/minuto}$ para las diversas
concentraciones de substrato utilizando una dosis constan-
te (1,1 unidades) de la preparación de enzima fructosil-

1 -transferasa del Ejemplo 1.

	% Substrato	$\mu\text{g/ml/min}$	$\mu\text{g/ml/min}^{\text{a)}$
	5	8,0	8,0
	10	11,8	11,6
5	20	15,7	15,2
	30	18,0	17,6
	40	18,6	18,2
	50	19,2	17,2
	60	17,8	18,2
10	70	15,6	-----

a) Realizada de nuevo al día siguiente a partir de una solución concentrada de sacarosa al 60%.

La K_m es una concentración de sacarosa 0,27 molar. La velocidad de reacción máxima se alcanzó para una concentración de substrato de sacarosa 1,374 molar, a pH 5,5 y a una temperatura de 55°C.

Ejemplo 6

Preparación e Isomerización del Substrato Secundario a partir de Sacarosa

20 A. Producción de Substrato Secundario

Se disuelve sacarosa de calidad para alimentación, 600 g, en agua a un volumen de 800 ml. El pH de esta solución se ajusta a 5,5 con ácido clorhídrico diluido. Una preparación seca de Celite-enzima, 11 g, con una actividad de 550 unidades/g, preparada como en el Ejemplo 1, se pone en suspensión en 100 ml de agua. La suspensión se filtra a vacío a través de papel de filtro Whatman Nº 1 en un embudo de Buchner. La torta de filtración se lava con 100 ml adicionales de agua. Los 200 ml de filtrado se añaden luego a la solución de sacarosa, la cual se encuentra

1 en un frasco de 1,9 litros provisto de tapón roscado. El
 frasco se pone luego en un baño de agua a 58°C, y se deja
 que la reacción continúe durante 20 horas, pasado cuyo
 tiempo se ensaya una muestra del producto de reacción por
 5 cromatografía líquida a alta presión para la determinación
 de la composición de hidratos de carbono con los resulta-
 dos siguientes:

Composición de Hidratos de Carbono

	Fructosa	2,4%
10	Dextrosa	32,8%
	DP ₂	10,6%
	DP ₃	22,9%
	DP ₄₊	31,3%

15 Se añade cloruro de magnesio al producto de
 reacción restante (esto es, el sustrato secundario) en
 una concentración de 5 milimolar, y se ajusta el pH a 8,4
 con hidróxido de sodio diluido.

B. Isomerización Continua del Sustrato Secundario

20 Glucosa-isomerasa derivada de *Streptomyces oli-*
vochromogenes ATCC 21.715 (véase Patente de EE.UU. No Re:
 29.152) se inmoviliza sobre alúmina porosa (un vehículo
 de poros controlados producido por Corning Glass Co., Cor-
 ning, Nueva York, p. ej., véase Patente de EE.UU. No
 3.992.329) como sigue:

- 25
1. El vehículo se lava dos veces con agua;
 2. El vehículo se incuba con citrato de sodio 0,1 M duran-
 te 1 hora con agitación;
 3. El citrato de sodio se separa por lavado del vehículo
 hasta que la conductividad de la solución de lavado es
 30 1000 micromhos;

- 1 4. El vehículo se incubaba con cloruro de magnesio 0,05 M
durante 1 hora y se decanta la solución de cloruro de
magnesio;
- 5 5. Se añade luego un volumen de cloruro de magnesio 0,05 M
para proporcionar una concentración final de enzima de
400 unidades/ml;
6. Se añade el concentrado de enzima isomerasa al vehículo
a un nivel de 0,495 millones de unidades por litro;
- 10 7. Se ponen en contacto el vehículo y la enzima durante
22-24 horas y luego se separa del vehículo por lavado
con agua destilada la enzima no fijada.

Una columna de vidrio provista de camisa (3 cm x
18 cm), equipada con una bomba conectada a un depósito de
suministro de alimentación, se carga después con la enzima
15 inmovilizada así preparada. El volumen del lecho de la co-
lumna después de la operación de carga es 45 ml. La columna
se opera a 60°C para todas las isomerizaciones. La columna
cargada se pone en servicio con un jarabe de dextrosa
(concentración 50% peso/peso) con concentración 5 milimo-
20 lar de cloruro de magnesio y se ajusta a pH 8,4 para demos-
trar que la columna es activa. El caudal que pasa por la
columna se ajusta a 292 ml/hora. La columna se vacía luego
hasta el nivel del lecho. Se efectúa la introducción del
substrato secundario manualmente hasta que se recogen 20
25 ml de efluente, y luego se ajusta el caudal del substrato
secundario a 292 ml/hora. Se desechan los primeros 100 ml
de jarabe recogidos para tener en cuenta el cambio de subs-
trato. El substrato secundario remanente (aproximadamente
850 ml) se pasa luego a través de la columna. Al cabo de
30 una hora, el caudal aumenta a 570 ml/hora. Se ajusta el

1 caudal y se mantiene a 300 ml/hora hasta el final de la
operación. Una vez completada la operación con substrato
secundario, la columna se vuelve a cambiar a dextrosa para
demostrar que persiste la actividad de isomerasa. La ta-
5 bla siguiente compara los análisis por cromatografía líqui-
da a alta presión del substrato secundario de partida y el
producto final procedente de la columna de isomerización:

	Substrato Secundario (A)	Producto Final (B)
10 Fructosa	2,4	15,7
Dextrosa	32,8	18,9
DP ₂	10,6	11,0
DP ₃	22,9	22,9
DP ₄₊	31,3	31,5

15 Estos resultados indican que el 42,38% de la dex-
trosa libre en el substrato secundario se isomeriza en la
columna a fructosa. Asimismo, los polímeros de fructosa
presentes en el substrato secundario no parecen ser afec-
tados ni afectar a la isomerización de dextrosa a fructo-
20 sa. Merece la pena destacar que la distribución total de
monosacáridos está constituida por aproximadamente 45% de
fructosa y 55% de dextrosa.

25 En el Ejemplo que sigue, se emplean dos métodos
para desdoblar los polisacáridos presentes en el substrato
secundario y también el producto de isomerización de los
mismos. Uno de los métodos es enzimático, y el otro utili-
za una hidrólisis ácida suave.

Ejemplo 7

Preparación de Jarabe Rico en Fructosa por Hidrólisis

A. Hidrólisis Enzimática

30

27068

1 100 ml del producto B del Ejemplo 6 se dosifican
 con 10 mg de una invertasa purificada derivada de Candida
utilis. Esta mezcla (conservada con tolueno) se deja reac-
 5 cionar durante la noche a la temperatura ambiente, después
 de lo cual se toma una muestra y se analiza por cromatogra-
 fía líquida a alta presión. Se deja que el Producto B re-
 manente continúe reaccionando durante 6 días más y luego
 se analiza una segunda muestra por el mismo procedimiento
 con los resultados siguientes:

10	Material de Partida (Pro- ducto B)	Después de la Acción de la Invertasa	Después de seis días adicionales	
	Fructosa	15,7%	41,9%	62,4%
	Dextrosa	18,9%	29,4%	36,2%
	DP ₂	11,0%	1,9%	0
15	DP ₃	22,9%	12,9%	0,5%
	DP ₄₊	31,5%	13,9%	0,9%

La invertasa empleada es una preparación de en-
 zima fabricada por Siekagaku Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japón,
 teniendo una actividad de 123 unidades/mg, donde 1 unidad
 20 de invertasa cataliza el desdoblamiento de sacarosa para
 formar 1 micromol de glucosa y 1 micromol de fructosa por
 minuto en condiciones especificadas.

B. Hidrólisis Ácida del Producto B

La hidrólisis ácida de una muestra del Producto
 25 B del Ejemplo 6 se llevó a cabo por adición de ácido sulfú-
 rico hasta una concentración de 0,05 N y calentamiento a
 75-80°C. Se toman muestras, después de una y dos horas de
 hidrólisis, y se analizan por cromatografía líquida a alta
 presión. Los resultados son como sigue:

	Material de Partida (Producto B)	1 Hora	2 Horas
1	Fructosa	15,7	60,3
	Dextrosa	18,9	38,7
5	DP ₂	11,0	1,9
	DP ₃	22,9	0,4
	DP ₄₊	31,5	0
			59,1
			37,9
			2,6
			0,3
			0,2

10 Los resultados anteriores indicados en la Etapa A muestran un aumento predominante en el rendimiento de fructosa y un aumento menor en el rendimiento de glucosa producidos con una disminución correspondiente en las fracciones DP₂, DP₃, y DP₄, demostrando así la presencia de un polímero de fructosa.

15 Los resultados de la hidrólisis ácida de la Etapa B están de acuerdo con los obtenidos en la Etapa A, demostrando también así el desdoblamiento de los polímeros de fructosa.

20 La exposición que antecede está enfocada a la transfructosilación utilizando un substrato primario en el que el contenido de sustancia seca de la sacarosa de partida no excede del punto de saturación en condiciones de reacción dadas. El ejemplo que sigue demuestra el uso de un substrato primario que tiene una concentración inicial de sacarosa que excede la de saturación y que, cuando se somete a la acción de la enzima fructosil-transferasa, da como resultado un producto que contiene niveles incrementados de material DP₃ (esto es, fructosil-sacarosa) y una concentración disminuida de productos DP₄₊. Se exhibe también un aumento en la concentración de sustancia seca

25

30

1 - (peso/peso) del substrato secundario sobre la concentra-
ción de sustancia seca obtenida en ausencia de la acción
de la enzima de fructosil-transferasa. Además, se demues-
tra que, cuando la concentración de sustancia seca del
5 substrato primario aumenta, el grado de polimerización del
polímero de fructosa en el substrato secundario disminuye,
y el material DP₄₊ está presente en pequeñas cantidades.

10 Esto está en contraste acusado con los resulta-
dos obtenidos en los ejemplos previos utilizando substrato
de sacarosa a concentraciones inferiores a la satura-
ción. En aquellos ejemplos, el material DP₄₊ es el produc-
to primario.

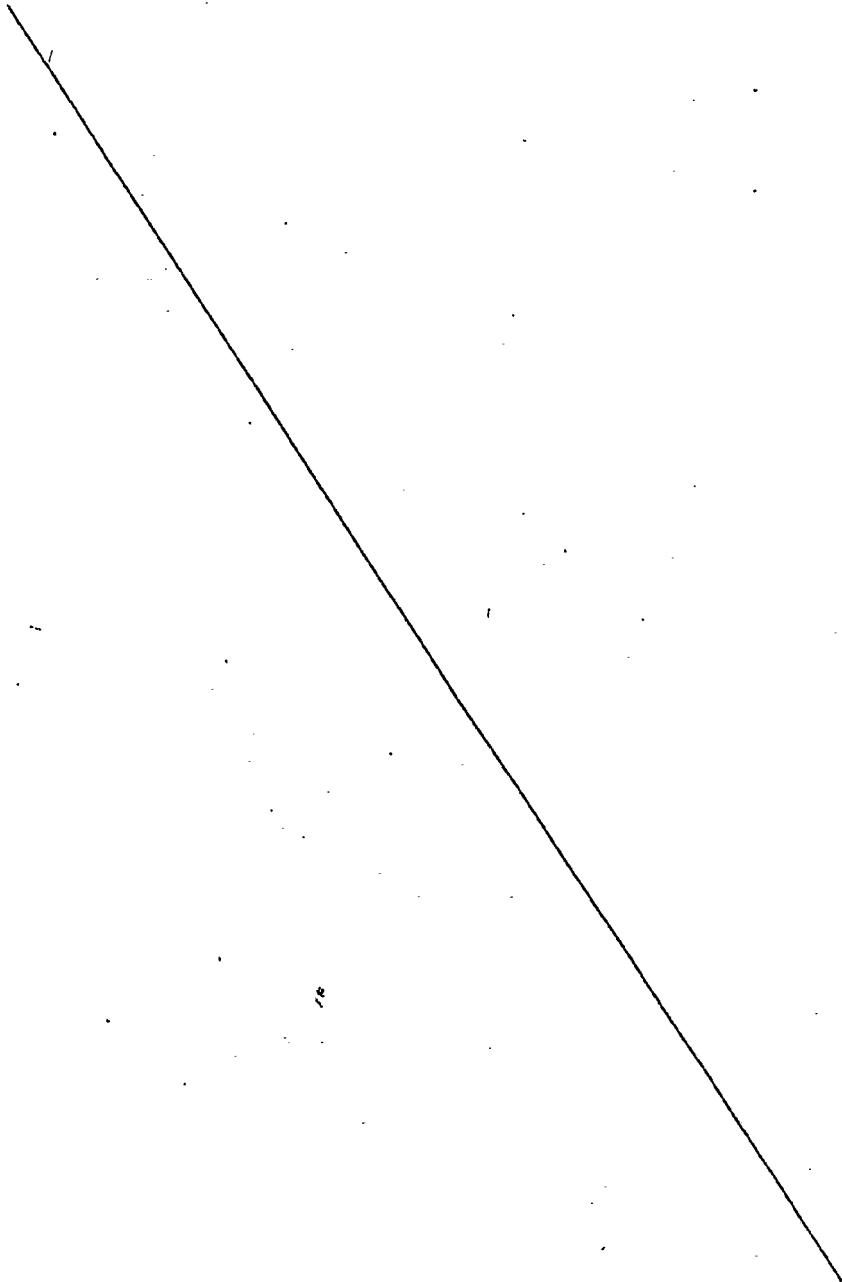
Ejemplo 8

Preparación de Substrato Secundario a partir de Suspensio- 15 nes de Sacarosa en Exceso de Saturación

Se pone Sacarosa de calidad para alimentación
en partes alícuotas de 200 g en tarros de 0,47 litros con
tapas de cápsula metálica roscada. Como testigo, se añaden
50 ml de agua a un tarro y los otros reciben cada uno 50
20 ml de agua que contiene cantidades crecientes de prepara-
ción de enzima fructosil-transferasa-Celite (producida de
acuerdo con el Ejemplo 1), como se muestra en la tabla si-
guiente. Cada uno de los tarros se tapa con la cápsula
metálica y se pone en un baño de agua en agitación que se
25 mantiene a 54°-55°C. Los frascos se someten a agitación
por sacudidas durante 24 horas con mezclado manual ocasio-
nal. Una muestra del sobrenadante se saca de cada botella
y se pone en un tubo de ensayo con cápsula roscada en un
baño de agua hirviente para inactivar la enzima. Estas
30 muestras se analizan después por cromatografía líquida a

1

alta presión y se realizan determinaciones de substancia seca en el sobrenadante (método de K. Fischer) con los resultados siguientes:



27068

Botella Nº	Sacarosa (g)	Unidades de Enzima ¹	Sustancia seca en el Sobrena- dante (peso/ peso)	Composición de Hidratos de Carbono en Solución por CLAP (%)				
				Fructosa	Dextrosa	DP ₂	DP ₃	DP ₄₊
1	200	100	74,5	0,6	9,6	80,9	8,9	ND ²
2	200	200	75,6	0,7	12,7	72,2	13,7	0,7
3	200	300	76,3	1,0	14,5	66,8	16,6	1,1
4	200	400	77,1	0,9	15,7	62,6	19,0	1,8
5	200	500	77,7	1,1	17,3	58,5	21,0	2,1
6	200	600	78,1	1,3	18,0	56,0	21,9	2,8
7	200	700	78,1	1,1	18,8	53,9	23,1	3,0
8	200	800	80,0	1,0	19,3	52,2	24,1	3,4
9	200	900	79,0	1,3	19,9	50,0	25,0	3,7
10	200	1000	79,6	1,3	20,6	48,6	25,4	4,1
Testigo	200	-	72,7	0,3	ND ²	99,7	ND ²	ND ²

¹ Unidades totales de enzima fructosil-transferasa en 50 ml de agua

² ND = no se detectó ninguno.

1 Merece la pena indicar que en el ejemplo que
antecede, la muestra testigo cristalizó cuando se enfrió
a la temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), mientras
que los substratos secundarios producidos enzimáticamente
5 permanecen en solución y exhiben una excelente estabilidad
de vida en almacenamiento sin recristalización.

 Aunque el Ejemplo 8 emplea 200 g de sacarosa por
50 ml de agua, esto es, 80% peso/peso, la concentración
de sustancia seca del material de partida de sacarosa pue-
10 de aumentarse.

 El nuevo substrato secundario de esta realiza-
ción puede utilizarse como un jarabe altamente estable y
no cristalizable en aplicaciones alimentarias. Proporciona
también una composición excepcionalmente rica en sustan-
15 cia seca, resistente a la contaminación microbiana y a la
formación de cuerpos coloreados, que puede emplearse para
transportar y/o almacenar el azúcar en concentraciones no
alcanzables hasta ahora en una forma que tiene las propie-
dades arriba descritas. Además, este nuevo substrato se-
20 cundario rico en sustancia seca puede someterse a hidrólisis
como se muestra en el Ejemplo 7 para obtener una mez-
cla de azúcar invertido que tiene un nivel de dulzor de-
seable. El nuevo substrato secundario de esta realización
tiene un contenido de sustancia seca (peso/peso) que va
25 desde aproximadamente 70% a aproximadamente 82% y contiene
una fracción de monosacáridos constituida esencialmente
por dextrosa y polímeros de polisacáridos, que exceden
de DP₂, constituidos predominantemente por producto DP₃.
Está también presente una cantidad menor (4,1% y conteni-
dos inferiores) de polímeros DP₄₊.

30

27068

1 Aunque la etapa de transfructosilación de esta
invención se ha presentado en términos de operaciones uni-
tarias por cargas, será evidente para los expertos en la
técnica que pueden emplearse análogamente operaciones uni-
5 tarias continuas. En la realización de tal transfructosi-
lación continua, la enzima transfructosilasa se inmoviliza
convenientemente utilizando las técnicas expuestas previa-
mente en la definición de enzima inmovilizada y la metodo-
logía de tratamiento continuo que se describe en ellas.

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 1ª.- Un método para producir un jarabe rico en fructosa a partir de sacarosa que comprende someter sacarosa a la acción de una cantidad efectiva de una preparación de enzima fructosil-transferasa para producir un producto de reacción que contiene polisacárido de fructosa y dextrosa.

15 2ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la sacarosa que sufre la acción de la enzima está a una concentración de al menos aproximadamente 20 por ciento.

3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que dicha preparación de enzima fructosil-transferasa se deriva de Pullularia pullulans.

20 4ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la sacarosa se somete a la acción de la enzima fructosil-transferasa a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 65°C, un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, y una concentración inicial de sacarosa

25 de al menos 10 por ciento (peso/volumen).

5ª.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que la dextrosa del producto de reacción se isomeriza para producir fructosa.

30 6ª.- El método de la reivindicación 5ª, en el que la isomerización se lleva a cabo utilizando una enzima inmo

07029

**POOR
QUALITY**

1. vilizada de glucosa-isomerasa.

7ª.- El método de la reivindicación 5ª, en el que la dextrosa se isomeriza a fructosa en presencia de dicho polisacárido.

5 8ª.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que dicho polisacárido se separa físicamente de la dextrosa.

9ª.- El método de la reivindicación 8ª, en el que dicha separación se realiza por ultrafiltración.

10 10ª.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 9ª, en el que el polisacárido del producto de reacción se hidroliza para producir fructosa.

15 11ª.- El método de la reivindicación 10ª, en el que el polisacárido se hidroliza en ausencia de enzima isomerasa activa.

12ª.- El método de la reivindicación 10ª, en el que el polisacárido se hidroliza después de la separación física de la dextrosa.

20 13ª.- Un método para producir un jarabe rico en fructosa a partir de sacarosa.

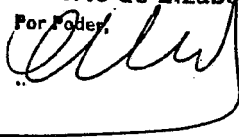
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de TREINTA Y CINCO hojas escritas a máquina por una sola cara.

25

Madrid, 12 FEB. 1979

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder

30

07029

VAL

**POOR
QUALITY**