



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-39073

54. TÍTULO

PRODUCCION DE JARABE INVERTIDO A PARTIR DE GUARAPO DE CAÑA DE
AZUCAR USANDO INVERTASA INMOVILIZADA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INSTITUTO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

DOMICILIO

MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO

74. APODERADO

GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Reg: 69-038073-00000-0000 Fax: 2008-04-25 17:07:18
 Cx: 2020 NUECREACIONES
 Tel: 41 PATENTEMIL Ene 378 FASENACIONALI
 Aut:411 PRESENTACION Fecha: 40

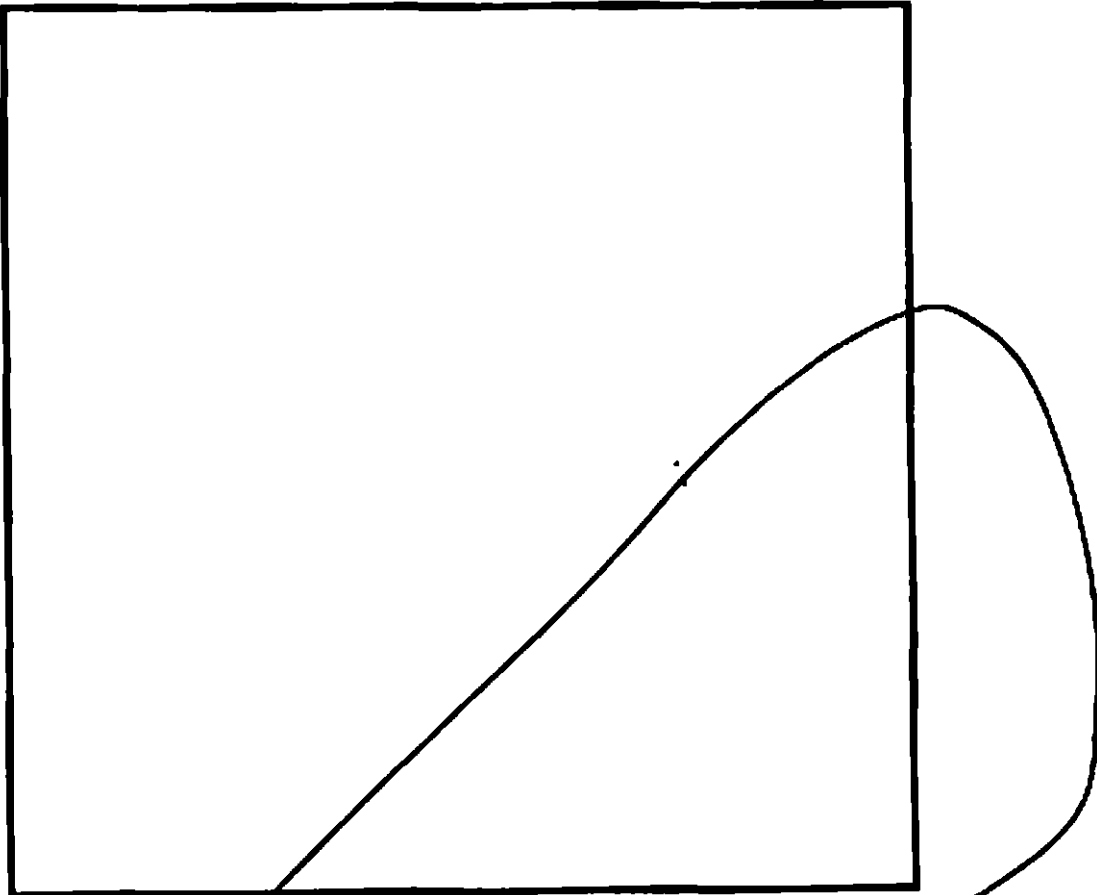
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I ☐ Capítulo II			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY Dirección: Avda. Eugenio Garza Sada Sur 2601 Nacionalidad o domicilio: Monterrey, Nuevo León, México Lugar de Constitución: México Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número Cual _____	
3 REPRESENTANTE O AP DERADO	Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12 Teléfono: 285 7400 Fax: 285 0267 E-mail: info@castillograu.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Número Cual _____ 17017.871 de TP 2.978 del Bogotá C.S.J.	
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: Sergio R. Gerna-Saldivar, Marco A. Rito-Palomares Dirección: Rosales 329A, Col. Santa Engracia; Lomas de la Rivera B408, Lomas de Cumbres 2do Sector Nacionalidad o Domicilio: San Pedro Garza García, Nuevo León, México; Monterrey, Nuevo León, México		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/IB2004/003163</u> Fecha: <u>Septiembre 29, 2004</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2005/031006 A2</u> Fecha: <u>Abril 7, 2005</u>			
6 Título (84) <u>PRODUCCIÓN DE JARABE INVERTIDO A PARTIR DE QUARAPO DE CAÑA DE AZÚCAR USANDO INVERTASA INMOVILIZADA</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>C13F ; C12P19/02</u>			
8 Prioridad Si ☒ No ☐	(33) País de origen <u>E.U.A.</u>	(32) Fecha <u>Septiembre 29, 2003</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/507,149</u>
9 Comprobante de pago N°: <u>314775</u> Fecha: _____			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA:

C.C. 17017.671
de BogotáT.P No. 2878/
del C.B.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 000170007-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 31,010
FECHA : ABRIL 25 DE 2004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
RUC: 08-000073-00000-0000 Fe: 2003-04-25 17:07:18
No. 2020 INUECREACIONES
Tm: 11 PATENTEMO Eno 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folio: 48

CONSINUACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Mo. PAGO	FECHA PGO	Gr. PAGO
ALLO ERMI Y ASOCIADOS	DISCONECACION	BANCO POPULAR	030-00100-6	37207240	25/04/2004	8,447,000.00

CONCEPTO

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDEN	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SUM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

**PRODUCCION DE JARABE INVERTIDO A PARTIR DE GUARAPO DE CAÑA
DE AZÚCAR USANDO INVERTASA INMOVILIZADA**

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona a un método para convertir el jugo (guarapo) o concentrado de caña de azúcar en un jarabe invertido (glucosa-fructosa) usando invertasa inmovilizada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Debido a su dulcura y forma líquida, los jarabes invertidos son ampliamente utilizados por diferentes segmentos de la industria alimentaria tales como las industrias de bebidas refrescantes y de panificación. Los jarabes son preferidos sobre la azúcar cristalizada debido a que presentan ventajas desde el punto de vista de procesamiento. Debido a su dulcura y presentación líquida y similitud con los jarabes fructosados de 42 y 55 (el número designa el contenido de fructosa como porcentaje del peso del contenido de azúcar total), los jarabes invertidos son altamente demandados por las industrias refresqueras. Actualmente, el azúcar refinada representa 60-62% del total de azúcar producida en el mundo a partir de de caña de azúcar y de otras fuentes. Aproximadamente 19.2 millones de hectáreas de caña de azúcar y otros cultivos productores de azúcar son plantadas anualmente rindiendo en promedio 142 millones de toneladas métricas de azúcar cristalizada. En el 2002, México fue el sexto productor mundial de azúcar con una producción de aproximadamente 5.2 millones de azúcar cruda [FAO 2003]. Sin embargo, recientemente, la industria ha caído en presiones financieras debido a la competencia en precios de productores extranjeros de jarabes de maíz glucosados y fructosados así como de otras fuentes productoras de azúcar. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar procesos más eficientes para refinar el jugo o guarapo de caña de azúcar y para la producción de jarabes invertidos los cuales representan un producto atractivo desde el punto de vista comercial y estratégico. Adicionalmente, sería ventajoso reacondicionar y modificar a los molinos o ingenios azucareros para que produzcan jarabes

5

1 invertidos más eficientemente sin eliminar la capacidad de producir azúcar de mesa o
2 sacarosa.

3 Durante las décadas anteriores, las industrias alimentarias y biotecnológicas han
4 incrementado el uso de enzimas inmovilizadas en varios procesos. Las principales ventajas
5 del uso de la tecnología enzimática inmovilizada son: menor costo de producción y
6 mejoramiento en la capacidad de producción debido a la habilidad de recuperar y reutilizar
7 a los catalizadores biológicos, los cuales son apropiados para procesos continuos de alto
8 rendimiento. Además, la enzima inmovilizada es más estable y el producto de la reacción
9 esta esencialmente libre de contaminación de la enzima, lo cual hace más fácil la
10 purificación del producto resultante (Messing 1975, Rosevear 1984).

11 Una de las principales desventajas de las enzimas inmovilizadas es el posible decremento en
12 su vida media productiva debido a la inactivación causada por contaminantes del sustrato. El
13 jugo de caña sin refinar, en particular, contiene cantidades significativas de inhibidores de la
14 invertasa tales como compuestos proteínicos y otros nitrogenados solubles e insolubles,
15 fenólicos, flavonoides, antocianinas, ceras y minerales (Clarke y Godshall 1988, Donovan
16 1993).

17 En el proceso convencional de refinamiento de azúcar de caña, el jugo crudo o guarapo es
18 normalmente tratado con cal, decalcado, y clarificado (remoción de sólidos suspendidos
19 generalmente por sedimentación) y el jugo semi-refinado resultante es purificado mediante
20 clarificación (carbonatación via adición de cal y dióxido de carbono o fosfatación via adición
21 de ácido fosfórico) y decoloración (Clarke y Godshall 1988, Donovan 1993). Este
22 tratamiento convencional, sin embargo, es inadecuado como paso preparativo para la
23 conversión con invertasa inmovilizada. La adición de más pasos de refinación antes de la
24 conversión enzimática haría la economía del proceso desfavorable o quizás hasta prohibitiva.
25 La adecuación del sustrato mediante purificación es importante para asegurar un uso más
26 eficiente del reactor con la invertasa inmovilizada. Un tipo de proceso, (Donovan et al., U.S.
27 Patent No. 6,406,548; Monclin 1995 U.S. Patent No. 5,468,300) propone la filtración del
28 jugo rico en sacarosa con ultrafiltración, ultracentrifugación y nanofiltración. El jugo

1 resultante puede ser utilizado en operaciones de evaporación y cristalización para producir
2 cristales de azúcar blanca. La patente U.S. Patent No. 5,468,300 de Monclin describe un
3 método para producir azúcar a partir de caña sin utilizar los pasos convencionales de
4 refinación; en lugar se utiliza ultracentrifugación o ultrafiltración y la remoción de
5 pigmentos a través de adsorción. Adicionalmente, Monclin emplea modificadores de
6 viscosidad. La aplicación de patente Sudafricana No. ZA200107964 también propone el uso
7 de microfiltración, ultrafiltración e intercambio aniónico como pasos de refinación para jugo
8 o concentrados de caña antes de la cristalización para producir azúcar de mesa. Pero ninguna
9 de estas referencias propone la conversión del jugo así refinado de caña de azúcar para
10 producir jarabe invertido a través del uso de un reactor con invertasa inmovilizada.

11 Los reactores enzimáticos con invertasa inmovilizada son capaces de producir soluciones
12 con azúcar invertida. La invertasa (beta-D-fructofuranosidasa fructohidrolasa EC 3.2.2.26)
13 hidroliza la conversión de sacarosa en fructosa y glucosa. La sacarosa puede ser convertida
14 a glucosa y fructosa a través de una hidrólisis ácida. Los procesos de escala industrial para
15 producir soluciones de glucosa-fructosa a partir de sacarosa generalmente emplean la
16 tecnología de hidrólisis ácida, la cual es cara, debido a que puede ser practicada solamente
17 en procesos de lote o semicontinuos. Además, la hidrólisis ácida se efectúa a un pH 2-3 lo
18 que produce un jarabe de baja calidad debido a que contiene furfural y otros compuestos
19 coloridos indeseables. No ha sido previamente reportado la producción de jarabes
20 invertidos en sistemas continuos de refinación y conversión enzimática, especialmente
21 iniciando con jugo crudo de caña o guarapo y adaptados para practicarse a gran escala en la
22 industria.

23 Han sido descritos numerosos métodos para la preparación de enzimas inmovilizadas y su
24 uso para otros propósitos y fines tales como los descritos por Nystrom en la Patente de los
25 EUA No. 3,935,068; por Long en la Patente EUA No. 3,935,069; por Amotz et al. en la
26 Patente EUA No. 3,980,521; por Monsan en la Patente EUA No. 4,405,715; por
27 Morimoto et al., en la Patente EUA No. 4,543,330; por Sulthoff en la Patente EUA No.
28 4,110,164; por Leuha et al. en la Patente EUA No. 4,918,016; por Harder et al. en la
29 Patente EUA Nos. 5,314,814 y 5,405,764; y por Kasumi et al. (1977) y Tsumura et al.

(1978). Messing (1975) y Rosevear (1984) reportan que la actividad catalítica de enzimas inmovilizadas se mantiene por mayor tiempo en comparación con las enzimas usadas en solución. Pero de nuevo, ninguna de estas referencias propone adaptar estas tecnologías para procesar jarabes invertidos a partir de jugo de caña de azúcar, mucho menos practicadas a escala industrial.

Martínez en la Patente EUA No. 6,013,491 describe métodos para preparar y usar levadura adherida a un soporte fibroso celulósico para convertir sacarosa en glucosa y fructosa y Ramos Lazcano en la Patente EUA No. 5,270,177 describe un método para la producción de jarabes glucosa-fructosa usando una cepa de levadura recombinante. Algunos sistemas de soporte permiten la regeneración de la actividad de la invertasa cuando la columna es tratada con compuestos químicos (Torres et al. 2003).

RESUMEN DE LA INVENCION

Uno de los objetivos de la presente invención es el de proveer un proceso novedoso para producir jarabes invertidos (glucosa-fructosa) a partir del jugo de caña de azúcar. Un objetivo más específico de la presente invención es el de proveer un proceso continuo para producir jarabes invertidos a partir de jugo de caña de azúcar, el cual puede ser practicado económicamente a gran escala.

El jugo crudo de caña de azúcar (guarapo) sin ser tratado previamente con los tratamientos convencionales de refinación (tales como adición de cal, desaeración, y clarificación a través de carbonatación o fosfatación o sedimentación) es primero y preferentemente refinado para remover a los sólidos así como material soluble, los cuales pueden inactivar a la enzima o que pueden reducir el desempeño y eficiencia del reactor que contiene una cama de la enzima inmovilizada.

Estos pasos de purificación pueden preferentemente ser llevados a cabo usando una combinación de (i) cuando menos dos pasos de filtración y (ii) el uso de intercambio aniónico, todos estos pasos llevados en unidades continuas de operación. El jugo

cf

posteriormente puede ser bienzimáticamente convertido a jarabe invertido en una columna empacada con un lecho de invertasa inmovilizada. Los pasos de filtración pueden incluir una combinación de filtrado para material grueso (v.gr. filtración de partículas), seguida de una filtración más fina (v.gr. microfiltración) o una combinación de microfiltración (partículas gruesas) y ultrafiltración (partículas finas) o las tres, o una o dos de ellas en combinación con aún otro paso de filtración. La única restricción es que el filtro grueso debe ser primeramente utilizado y que ninguno de los filtros finos retenga a las moléculas de azúcar (tales como fructosa o glucosa o sacarosa) que son los compuestos o precursores deseados para llegar al producto final. Por lo tanto, ninguno de los pasos de filtración debe retener sustancias con peso molecular de 400 o menos (correspondientes a un tamaño de aproximadamente 0.003 μm). Preferentemente los dos pasos de filtración deben retener a sustancias con pesos moleculares de 4000 o mayores, v.gr., 10,000 Da. Por lo tanto, haciendo posible el uso de tecnologías de membrana menos rigurosas o más flexibles y sistemas de filtración menos caros. Preferentemente debe existir un paso de pasteurización especialmente cuando la ultrafiltración no es utilizada. La pasteurización puede ser una opción práctica a pesar del empleo de la ultrafiltración. El requerimiento o no de la pasteurización dependerá del tiempo que se demore desde la extracción del jugo y terminación de los dos pasos de filtración.. Preferentemente la pasteurización debe ser combinada con la concentración.

Es ventajoso en el presente proceso que el jugo de caña de azúcar refinado puede sea parcialmente concentrado (preferentemente hasta 50-55°Brix) antes de entrar al paso de conversión enzimática. Esto significa que puede haber un paso de concentración inmediatamente antes de la conversión enzimática o todavía más temprano en el proceso v.gr. simultáneamente con el paso de intercambio aniónico o entre estos pasos. (v.gr. por concentración de toda o algo de la porción refluente del material de salida del paso de intercambio aniónico) o antes al intercambio aniónico (al final de la filtración) o antes de completar la filtración (entre las etapas tempranas y finales de los pasos de filtración). La etapa de concentración puede ser ventajosamente combinada con el paso de pasteurización.

Es todavía mas deseable recombinar el jugo filtrado y parcialmente concentrado (o sin concentrar) a otra etapa de purificación a través de intercambio aniónico antes de realizar el

9

1 paso de conversión enzimática, o una porción de reflujo del jugo refinado puede ser
2 concentrado (o concentrado todavía más) antes de ser redireccionado a la etapa de
3 intercambio aniónico.

4 La material prima inicial de la presente invención es el jugo de caña crudo o guarapo (v.gr.
5 recién extraído sin procesar) obtenido después de prensar a la caña de azúcar. Este material
6 es convertido a jarabe invertido usando un sistema inmovilizado con invertasa,
7 preferentemente en un sistema totalmente continuo. El jugo de caña es refinado antes de la
8 conversión para remover sólidos y sustancias (tanto solubles como insolubles) que pueden
9 inhibir, o inactivar, o impedir el desempeño de la enzima usada en el paso de conversión.
10 Convenientemente, la primera fracción de sólidos contaminantes puede ser removida por un
11 proceso de filtración practicado en al menos dos etapas tales como filtración de partículas o
12 microfiltración. Una segunda fracción de contaminantes sólidos y una primera fracción de
13 contaminantes solubles pueden ser removidos por una segunda tecnología de filtración tal
14 como microfiltración (or ultrafiltración). Preferentemente, tanto la microfiltración y
15 ultrafiltración deben ser empleadas en ese orden o opcionalmente en combinación con el
16 caso de filtración ordinaria de partículas empleado primeramente. Posteriormente, una
17 columna empacada con resina de intercambio aniónico puede ser utilizada para remover
18 contaminantes solubles adicionales.

19 En una modalidad preferente del presente invento, el jugo de caña contiene de 15-23° Brix
20 después de la extracción de la caña de azúcar. Del 92-96% del contenido de azúcar de la caña
21 es extraído como sacarosa. A la vez, el azúcar representa del 75-92% de los sólidos del jugo
22 de caña de azúcar. El jugo de caña es pasado cuando menos una vez a través de una unidad
23 de microfiltración equipada con una membrana de 0.2 μ m y una unidad de ultrafiltración
24 equipada con una membrana de un corte molecular de 10,000 Daltons. Los pasos de
25 microfiltración y ultrafiltración también remueven muchos microorganismos, dejando al jugo
26 con una menor carga microbiana. Estos pasos de purificación son seleccionados en base a su
27 habilidad para remover a los contaminantes, y a su vez que minimizen pérdidas de azúcar. El
28 jugo resultante ultrafiltrado (semipurificado) es pasado cuando menos una vez a través de
29 una columna empacada con una resina de intercambio aniónico que posea una fuerte

1 afinidad por contaminantes fenólicos y nitrogenados, tal como la resina Diaion WA 30
 2 (Sigma Aldrich St Louis Missouri). Estos pasos de purificación son seleccionados para
 3 remover contaminantes pero no azúcar.

4 En una alternativa de la modalidad preferente, el jugo crudo de caña de azúcar o guarapo es
 5 primariamente filtrado usando un filtro de partículas (malla) donde pasen partículas no
 6 mayores a 250 micrones or inclusive una malla 100 para remover aquellas partículas sólidas.
 7 Un rotocernidor con antolimpieza (HONIKON, Jeanerette, Louisiana) puede ser utilizada
 8 para este propósito. El jugo saliente de esta etapa es preferentemente pasteurizado y
 9 simultáneamente parcialmente concentrado, v.gr. a 40-50° Brix, y posteriormente filtrado por
 10 lo menos en un filtro fino, preferentemente con un equipo de microfiltración de membrana.
 11 El jugo saliente de la unidad de microfiltración es sujeto a un tratamiento con intercambio
 12 aniónico. Una de las ventajas de esta modalidad es que el paso de la ultrafiltración que es
 13 relativamente cara es reemplazada por pasos relativamente baratos, como son la filtración de
 14 partículas combinada con pasteurización, este último paso para reducir la carga microbiana
 15 dado a que la filtración ordinaria, a diferencia de la ultrafiltración, no remueve bacterias u
 16 otros microorganismos.

17 En este punto, el jugo de caña refinado puede ser parcialmente o concentrado todavía más en
 18 caso de que se halla empleado un paso de concentración más temprano en el proceso (hasta
 19 aproximadamente 50-55° Brix). El jarabe invertido terminado debe contener 68° Brix o más
 20 (típicamente hasta cerca de 70°) para evitar el crecimiento de microorganismos y reducir
 21 costos de transporte. El jugo de la caña de azúcar después de los pasos de filtración y
 22 preferentemente después de un paso a través de la columna de intercambio aniónico puede
 23 ser concentrado hasta 71° Brix (preferentemente a aproximadamente 50-55° Brix) usando
 24 evaporadores convencionales tales como los comúnmente empleados o utilizados por los
 25 Ingenios azucareros o industrias productoras de jarabes mientras todavía sea susceptible a la
 26 purificación en la columna de intercambio aniónico. El jugo de caña tratado puede ser
 27 preferentemente refinado más (v.gr. a través de uno o más pasos adicionales a través de la
 28 columna de intercambio aniónico) antes de pasar a través del reactor de lecho empacado
 29 provisto con inversina immobilizada. Durante la evaporación, todos los contaminantes se

1 concentran así que, si se desea, el concentrado puede ser ventajosamente pasado una o varias
2 veces a través de la misma o diferente columna de resina de intercambio aniónico. Varias
3 pruebas de laboratorio mostraron que este paso adicional de refinación a través de la columna
4 aniónica posterior a la concentración, disminuyó: adicionalmente, después de un paso por
5 columna aniónica y vuelto a resujetar a un segundo paso aniónico, un 42% de los compuestos
6 fenólicos residuales y 24% de la proteína residual, respectivamente en jugo de caña
7 concentrado entre 50-55° Brix. Este paso adicional produce un jarabe con un color más
8 ligero y prolonga aún más la vida media de la enzima inmovilizada presente en el reactor de
9 conversión. Alternativamente, o en adición a los pasos múltiples de intercambio aniónico, la
10 porción refluente del jugo tratado con intercambio aniónico puede ser concentrado antes de
11 regresar a la columna de intercambio aniónico.

12 Antes de entrar a la columna de hidrólisis enzimática, el jugo de caña opcionalmente
13 concentrado y tratado en la columna de intercambio aniónico preferentemente contiene los
14 siguientes valores:

15 Contenido de azúcar: 15-25° Brix, si no está concentrado, o hasta aproximadamente 50°
16 Brix si se concentra;

17 Contenido de sacarosa: 92-96% basado en el peso total de azúcares;

18 Contenido de sólidos residuales (disueltos) no-azucarados: menos del 1% por peso;

19 Contenido de compuestos fenólicos residuales (disueltos): 53.24 ppm;

20 Contenido de minerales residuales: 0.08% or menos por peso.

21 Se cree que el proceso de la invención también reduce fuertemente los contenidos de
22 flavonoides, antocianinas y ceras presentes en el jugo de caña de azúcar.

23 Las condiciones del reactor y tasa de alimentación pueden ser ajustadas para lograr
24 conversiones mayores del 90%. Es importante obtener conversiones mayores de 90% puesto

12

que de otra manera la sacarosa residual puede cristalizar y degradar la calidad del jarabe. La invertasa trabaja óptimamente a un pH de 4.5 a 6.0 y a una temperatura de 45 a 60°C, así que se prefiere que el paso de conversión se realice bajo un control de temperatura y pH. El jarabe invertido resultante puede ser opcionalmente concentrado usando evaporadores convencionales (típicamente a aproximadamente 70°Brix), ajustado su pH (dentro de un rango de 4.0 a 5.0) o adicionalmente refinado usando una columna aniónica como la descrita anteriormente u otro medio de adsorción, como por ejemplo, un sistema empleando carbón activado. La concentración reduce el volumen e incrementa el contenido de grados Brix y tiene el efecto de disuadir el desarrollo de microorganismos y reducir costos de transporte. El tratamiento adicional post-conversión remueve proteína residual y otros remanentes de compuestos colonizados indeseables.

En otro aspecto, la invención se dirige a aparatos que incluyen equipos para realizar las operaciones unitarias continuas anteriormente descritas, esto es, principalmente una unidad de microfiltración, una unidad de ultrafiltración conectada en serie a unidades de microfiltración para recibir el jugo macrofiltrado y producir jugo ultrafiltrado, una columna de intercambio aniónico con o sin capacidad de reflujo (la corriente de reflujo saliente de la columna puede ser opcionalmente conectada para alimentar al concentrador y el material saliente regresado a la columna), una columna de intercambio aniónico que recibe al jugo micro o ultrafiltrado y produce un jugo de caña de azúcar tratado con la resina de intercambio aniónico y un reactor de columna que contiene la invertasa montada en un soporte sólido.

Las ventajas de la presente invención incluyen sin limitación la habilidad para realizar la conversión a jarabe invertido de una manera efectiva y continua usando un proceso que fácilmente se puede adaptar a escala comercial, y la habilidad para prolongar o extender la vida de la enzima en un reactor de columna con operación ininterrumpida que por lo tanto mejora la eficiencia del proceso.

Los objetivos, características, y ventajas de la invención adicionales pueden ser mas fácilmente entendibles de la descripción detallada presentada posteriormente.

M

PEQUEÑA DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 es un diagrama de flujo del proceso para elaborar jarabe invertido de acuerdo a la presente invención.

FIG. 2 es un diagrama de flujo de otro proceso para elaborar jarabe invertido de acuerdo a la presente invención.

FIG. 3 es una gráfica de la actividad remanente de invertasa nativa y modificada graficada contra tiempo de incubación.

FIG. 4 es una gráfica de la invertasa modificada (2U/ml) recuperada por su uso en diferentes membranas de diálisis.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención está enfocada a un proceso novedoso para producir jarabe invertido utilizando jugo crudo de caña de azúcar (guarapo) obtenido via procesos de extracción convencional. La invención incluye una primera etapa, (purificación y opcional de concentración parcial del jugo crudo de caña de azúcar) y una segunda etapa (conversión enzimática del jugo refinado de caña de azúcar utilizando invertasa inmovilizada y opcionalmente la concentración adicional del jarabe invertido resultante tal como se ilustra en la FIG. 1). Después de la obtención del jugo crudo de caña de azúcar por procedimiento extractivos tradicionales (maceración, tratamiento con cal y/o otros pasos de refinación convencionales para remover a sólidos duros o gruesos, por consiguiente estos pasos para mejorar la claridad y la remoción de color pueden ser y son preferentemente omitidos excepto posiblemente por el paso de sedimentación usado para remover sólidos gruesos), el jugo es filtrado y purificado con resinas de intercambio aniónico en preparación al paso de conversión. Adicionalmente, pasos de refinación posteriores pueden seguir al paso de conversión.

El jugo de caña de azúcar se somete a operaciones de remoción de sólidos tales como microfiltración y ultrafiltración o filtración de partículas y microfiltración con el objetivo de remover contaminantes insolubles finos y una primera fracción significativa de contaminantes solubles. La unidad de microfiltración equipada con una membrana de 0.2 μm de diámetro seguida en serie por una unidad de ultrafiltración equipada con una membrana para separar contaminantes con pesos moleculares mayores a 10,000 daltones (lo cual corresponde a tamaños mayores que 0.005 μm) son particularmente preferidos. Equipos con un corte de peso molecular menor son aceptables, tal como se describió supra, mientras no causen la retención de moléculas de azúcar ni incrementen innecesariamente los costos de proceso y equipo. (Tal como se utiliza en este documento, la retención substancial de azúcares contenidos en el jugo de caña de azúcar significa retener al menos 85% y preferentemente al menos 90% del contenido original de azúcar en el jugo). Estas dos técnicas de separación practicadas en serie reducen significativamente (típicamente por más del 90%) el contenido de proteína insoluble presente en el jugo original determinado por la técnica de Biuret (Gomall et al, 1949). Alternativamente, una combinación de filtración de partículas mediante el paso a través de un filtro v.gr. malla No. 100 seguida por microfiltración tal como se describió anteriormente puede ser practicada. Preferentemente, el jugo se pasteuriza y opcionalmente y simultáneamente se concentra a 35-50° Brix entre el primero y segundo paso de filtración. El paso de pasteurización es de mucho beneficio en modalidades donde la ultrafiltración no se emplea.

Cada uno de los pasos de proceso pueden ser realizados más de una vez, resultando en una mejor remoción de sólidos. Sin embargo, a pesar del uso de estas técnicas sofisticadas de remoción de sólidos, el jugo de caña de azúcar todavía contendrá componentes que afectan adversamente a la invertasa y/o el desempeño del reactor. Por esta razón, el jugo de caña de azúcar parcialmente refinado es adicionalmente sujeto a un paso de intercambio iónico para reducir la cantidad de compuestos solubles indeseables. Una gran variedad de materiales de intercambio iónico pueden ser usados; v.gr. dietilaminocelulosa, estireno, acrílico y agarosa. La agarosa es preferida desde el punto de vista de costo; la celulosa es preferida debido a que tiene tanto un buen desempeño como un bajo costo.

6

La remoción de componentes solubles indeseables puede ser preferentemente logrado a través de una columna de intercambio aniónico que posee una fuerte afinidad por fenólicos y compuestos nitrogenados. Este paso de intercambio aniónico ha probado ser muy efectivo para clarificar el jugo y remover todavía mas compuestos indeseables en preparación a la conversión enzimática.

La pasteurización puede ser llevada a cabo a una temperatura tan baja como de 61.5°C o a una temperatura mayor, v.gr., 72°C. Se debe tener cuidado de no afectar adversamente la calidad del jarabe invertido de tal manera que despues de la conversión menores temperaturas de concentración y pasteurización deben ser empleadas. .

EjemPlo 1

En referencia particular a la Fig. 1, la caña de azúcar fue extraída usando técnicas convencionales en la etapa de extracción 1. El extracto crudo 101 (características mostradas en la Tabla 1) alimentado a una tasa de 12.0L/hr fue pasado a través de un sistema Quick Stan Benchtop equipado con una unidad de microfiltración (2 en la Fig. 1) manufacturado por A/G Technology modelo no. QSM-04SAP equipado con una membrana de filtración de 0.2µm que resiste una caída de presión máxima de 30 psi para producir un jugo de caña de azúcar microfiltrado 201 cuyas características se ilustran en la segunda columna de la Tabla 1. Los contaminantes 202 fueron principalmente proteínas, peptidos, fenólicos y otros compuestos coloreados. El jugo microfiltrado 201 fue posteriormente sometido a una ultrafiltración con una unidad manufacturada por A/G Technology, modelo no. QSM-04SAP (3 en la Fig. 1) que trabaja bajo una caída de presión máxima de 30 psi para producir un jugo de caña de azúcar ultrafiltrado 301. Los contaminantes 302 fueron principalmente proteínas, peptidos, fenólicos y otros compuestos coloreados. El jugo ultrafiltrado 301 fue posteriormente pasado a una columna de intercambio aniónico (4 en la Fig. 1) bajo condiciones de pH 5.5 usando una columna de vidrio y una resina débil de intercambio aniónico (Dialon WA 30) comercialmente disponible de la compañía Sigma Aldrich (St. Louis Missouri). La resina tuvo un tamaño de partícula promedio de 16-50 µm, de naturaleza porosa, activada con alkylamina y con una capacidad de 1.5 meq/ml (Supelco). La resina fue previamente tratada con una solución de fosfato de sodio 0.05 M ajustada a un

pH de 5. La columna de vidrio utilizada para empacar a la resina tenía 30 cm de largo y un diámetro interno de 2.5 cm. La resina empacada de 15 cm de largo fue tratada con una solución amortiguada de acetato de sodio hasta que el pH de la solución de salida fuera de 4.5. El jugo de caña ultrafiltrado fue pasado una sola vez a través de la columna. En este paso, aproximadamente el 50% de los compuestos fenólicos fueron removidos de acuerdo a la técnica analítica Folin Ciocalteau (Swain y Hillis 1959).

El jugo de caña de azúcar tratado con la resina de intercambio aniónica 401 contuvo las características especificadas en una de las columnas de la Tabla 1.

En este punto, la corriente entera 401 puede ser concentrada en la etapa de concentración (5 en la Fig. 1) y pasada a través de la misma columna de intercambio aniónico o una porción refluente del mismo, corriente 401A puede ser concentrada, antes de retornarla a través de la misma columna (corriente 501 en la Fig. 1) la cual podría también regresar a un punto intermedio de la columna dependiendo del contenido de impurezas de la corriente de reflujo concentrada. Alternativamente, la corriente 401, puede ser concentrada y pasada a través de una segunda columna de intercambio aniónico (no mostrada). La redirección del concentrado 501 a través de la columna de intercambio aniónico 4 (o el paso a través de otra columna de intercambio aniónico) remueve contaminantes solubles adicionales resultando en una corriente más purificada (no mostrada por separado en la Fig. 1). La corriente 401 posteriormente llega el producto de alimentación del reactor en columna (6 en la Fig. 1).

EJEMPLO 2

La invertasa (Grado VII, No. Catalogo I 4504, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) fue inmovilizada por simple adsorción en perlas de quitosan (Chitopearl BCW 3505, Wako Chemicals USA, Inc.). El tamaño de las perlas fue de 350-390 μm y contenían una capacidad de intercambio iónico 0.2 -0.3 meq/ml con una superficie específica de 150-200 m^2/g . Las perlas de quitosan fueron lavadas tres veces con agua destilada y una solución de acetato de sodio 0.02 M (pH 4.5). La invertasa fue adicionada a las perlas de quitosan en una tasa de aproximadamente 2,000 unidades enzimáticas/g perlas y la suspensión resultante fue mantenida por agitación por 60 min a temperatura ambiente. La solución fue filtrada y las

9
17

perlas de quitosan que contenían a la invertasa inmovilizada fue lavada una vez con la solución de acetato de sodio 0.02 M (pH 4.5).

El material enzimático inmovilizado en perlas de quitosan fue utilizado para empacar una columna enchaquetada de 20 cm de largo (Tipo XK-16 Pharmacia) con un diámetro interno de 16 mm. El largo del soporte de enzima inmovilizada fue ajustado a 120 mm. Perlas de zirconium fueron colocadas en la parte superior e inferior de la columna. El zirconium fue utilizado como material inerte simplemente para evitar pérdida del soporte de la columna. En operaciones comerciales platos o bandejas especiales provistos con mallas son utilizados en lugar del zirconium u otros materiales inertes. La columna fue equilibrada a una temperatura de 50°C mediante la circulación de agua calentada a través de la chaqueta de la columna. El concentrado refinado de caña de azúcar 401 con 50-55° Brix fue bombeado a través de la columna o reactor enzimático a un flujo ajustado para propiciar un tiempo de residencia de 10 min. La cantidad de azúcar en el sustrato y producto fue determinado con el método colorimétrico de ácido dinitrosalicílico y mediante cromatografía de alta resolución equipada con un detector de índice de refracción. Bajo estas condiciones, más del 95% de la sacarosa fue convertida en glucosa y fructosa (jarabe invertido). La relación glucosa a fructosa en el producto fue de 1:1. Las características de la corriente del producto 601 también se muestran en la Tabla 1. Finalmente el producto jarabe invertido 601 fue concentrado a contener 68-70° Brix en el evaporador 7 y opcionalmente puede ser más refinado para llenar las especificaciones demandadas por la industria. Estos ajustes finales pueden ser llevados a cabo usando operaciones unitarias convencionales y técnicas de refinación como el uso de columnas empacadas de adsorción con carbon activado para mejorar el color del jarabe.

EJEMPLO 3

Este ejemplo es una simulación por lotes secuenciales de un proceso continuo como una alternativa preferida ejemplificante de la presente invención. En referencia particular a la Fig. 2, la caña de azúcar fue extraída usando técnicas convencionales de la etapa de extracción 21. En la primera etapa de filtración 22, el extracto crudo 1001 con características mostradas en la Tabla 2 fue primeramente pasado a través de la malla No. 100 (100 mesh) a

presión atmosférica. Los sólidos contaminantes relativamente gruesos 2002 fueron colectados por un filtro y descartados. El jugo primeramente filtrado 2001 es primeramente pasteurizado en la etapa 23 a 61.5°C por 0.5 horas (o a una temperatura mayor, v.gr., 72°C por un período más corto de tiempo, v.gr. 15 seg.) y al mismo tiempo concentrado mediante evaporación hasta a 50° Brix. El jugo pasteurizado/concentrado 3001 fue pasado a través de un cartucho de microfiltración 24 (2800 cm², CFP-2E-6A elaborado por Amersham Biosciences Buckinghamshire, UK) que tenía una membrana con un diámetro de poro de 0.2 µm equipado con una bomba (E-trac WFCHT elaborada por Inverter), operando a una presión de 13 psi para remover a partículas sólidas finas (cenizas finas, compuestos coloreados) así como para reducir la carga de levaduras y bacterias, y proteínas de alto peso molecular (peso molecular de aproximadamente > 100kD) los cuales fueron descartados (4001).

Periódicamente, después de 6 a 8 horas de uso de la unidad de microfiltración, la membrana fue regenerada mediante dos lavados con una solución 0.2 M de NaOH a 50°C. El NaOH requirió de lavados (3 veces) con agua o neutralización con una solución 1N de HCl.

El jugo microfiltrado, corriente filtrada fina 4002, representa el producto intermedio filtrado en dos etapas. Las características de este producto intermedio son mostradas en la Tabla 2. El producto intermedio aún tenía un color indeseable café oscuro, lo cual indicaba que tenía presentes fenólicos y otros compuestos coloreados.

El producto intermedio 4002 fue posteriormente sujeto a la etapa de intercambio aniónico 25: fue alimentado en la parte superior de la columna de 500 ml (450 ml de volumen de trabajo) equipado con resina microgranular de intercambio aniónica Whatman DE52, con una capacidad de 0.88–1.08 meq/g (Whatman, New York, USA). El *buffer* de fosfato de sodio fue utilizado para equilibrar a la columna a un pH de 5 antes de alimentar al producto intermedio 4002.

El producto resultante del intercambio aniónico 5001 que eluyó de la columna tuvo las características mostradas en la Tabla 2. Los contaminantes removidos 5002 incluyeron a ácidos fenólicos y otros compuestos coloreados, dejando un producto de tonalidad amarillo

9

pálido 5001. Estos pasos también decrementaron el contenido de compuestos nitrogenados inhibidores de la invertasa aunque las medidas no fueron realizadas en este ejemplo.

El producto tratado con la resina aniónica 5001 fue posteriormente sujeto a una hidrólisis enzimática del paso 27 usando una columna en la cual invertasa (Maxiveri L10000 de *Saccharomyces cerevisiae* con una actividad de 10,000 U/ml, DSM, Francia) fue inmovilizada en Chitopearls™ usado como soporte. La carga de enzima en el soporte fue lograda tal como se describe en el Ejemplo 4.

La columna fue mantenida a 60°C, pH 5 y la conversión a jarabe invertido se realizó en el producto tratado con la resina aniónica que fluyó a través de la columna. Los Chitopearls™ fueron escogidos entre otros soportes en parte debido a su eficiencia, bajo costo y bajos costos de operación y en parte debido a que posee algo de capacidad de intercambio iónico que mejoró aún más el color del jarabe. Un líquido incoloro 7001 cayó de la columna catalítica.

Después de que la invertasa se agotó (debido a crecimiento microbiano como resultado del uso intermitente por un total de aproximadamente 7 días) el soporte fue lavado con NaOH 1N para que eluyera la invertasa, lavado tres veces con agua destilada y recargada con enzima nueva tal como se describió anteriormente. El soporte tiene una vida útil prolongada y puede ser limpiado, cargado de nuevo con enzima nueva y reutilizado varias veces antes de que tenga que ser reemplazado. La restricción del crecimiento microbiano puede extender los días de operación de la invertasa.

El jarabe invertido que eluye de la columna catalítica posee las características especificadas en la Tabla 2.

El jarabe invertido puede ser concentrado a 68-70° Brix después de la conversión enzimática. La concentración post-conversión puede ser efectuada en un evaporador con vacío a 60°C para evitar la formación de color en el jarabe invertido ocasionado por efecto de altas temperaturas.

La concentración preconversión produce un producto con 40-50° Brix inmediatamente antes de la conversión (esto puede ser hecho usando una perción o todo el producto de la columna de intercambio aniónico tal como se ilustra en la Fig. 2, corriente 5001). A dentro del paso 26 y la corriente concentrada 5002 que regresa a un punto superior o intermedio (no mostrado del paso 25). Los diferentes lugares o locaciones de las etapas de concentración del proceso tienen diferentes ventajas y desventajas. La concentración preconversión permite trabajar con volúmenes reducidos y decrementan la tasa de crecimiento de microorganismos debido a la alta concentración de azúcares; sin embargo, la mayor viscosidad de la solución afecta negativamente el desempeño de las membranas de microfiltración (y ultrafiltración, si hay) causando un incremento en la caída de presión.

11 EJEMPLO 4: INMOBILIZACION ENZIMATICA

Una solución de 2500 U/mL de invertasa (Maxinvert L10,000, DSM, France) solution en un buffer 50 mM de fosfato con pH 5 fue modificada de acuerdo al protocolo reportado por Hsieh (2000). 30 mg de invertasa (412 U/mg) se disolvieron en 29 ml de *buffer* 50 mM de fosfato, pH 5.0 y a su vez mezclados con 1 ml de periodato de sodio 30 mM por 3 hr a 4°C en la oscuridad. El periodato de sodio que no reaccionó fue removido mediante la adición de 0.2 ml de etilen glicol y mezclado por 30 min. La invertasa resultante oxidada con periodato fue dializada contra un *buffer* de fosfato 50 mM, pH 6.0. La Figura 3 (una gráfica de la actividad remanente a 55°C en sacarosa 1M pH 6 de invertasa nativa y modificada (2U/ml) previamente incubada a la misma temperatura graficada contra el tiempo de incubación) muestra que la invertasa modificada tuvo una mayor actividad que la enzima nativa y que el paso de modificación incrementa la vida útil de la enzima. Por ejemplo, la enzima nativa perdió 75% de su actividad inicial en 6 horas, mientras que la enzima modificada demoró aproximadamente 27 horas.

Durante el proceso de modificación, la diálisis se utilizó para eliminar a los reactivos necesarios para la modificación (periodato de sodio y etilen glicol). La diálisis puede ser hecha usando una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa (una membrana con un corte mayor puede ser usada v.gr. en exceso de 25 kDa). Los resultados mostrados en la

21

Figura 4 (una gráfica de actividad a 55°C en una solución de sacarosa 1M a pH 6 de la invertasa modificada (2U/ml) recuperada por diferentes membranas dializadoras con cortes de peso molecular de 10 kDa, 15 kDa, y 25 kDa demostraron que la actividad de la enzima modificada no es influenciada por el tipo de membrana dializadora.

Más experimentos fueron realizados usando enzima modificada para seleccionar el soporte más conveniente para la inmovilización. Alúmina, Sephabeads® y Chitopearl™ fueron utilizados para estos propósitos. Las perlas de quitosán fueron seleccionadas como soporte para la inmovilización enzimática ya que son muy fácil de preparar, su uso es más barato, y su preparación es más rápida en comparación con otros soportes comúnmente empleados. Además, las perlas de quitosán tienen una mucho mayor vida útil y requieren de menos enzima de tal manera que el proceso de inmovilización fue eficiente. Finalmente, tal como se resultó en el Ejemplo 3, este soporte tiene algo de habilidad de intercambio iónico lo cual mejora aún más el color o claridad del jarabe producido.

Antes de la inmovilización los Chitopearl™ BCW 3505 (Fuji Spinning Co., Ltd, Japón) fueron lavados tres veces con agua destilada. El exceso de agua fue decantada y 40g (50 ml) de Chitopearl™ fueron empaquetados dentro de una columna de vidrio de 30 cm largo y un diámetro interno de 1.5 cm (50 ml de volumen de trabajo) equipada con una chaqueta y tapas permeables de malla y tela en ambas terminaciones de la columna. La invertasa modificada fue inmovilizada por simple absorción v.gr. pasando la solución enzimática a través de una columna para alcanzar una concentración de 1000-3000 IU/g. Antes de su uso, un buffer 50 mM de NaH₂PO₄, pH 5 fue pasado a través de la columna hasta que la solución de salida tuviera un pH de 5. La temperatura de operación fue fijada a 60°C. La enzima inmovilizada fue utilizada para convertir a las soluciones de prueba (sacarosa en agua conteniendo 34-50% de sacarosa) en jarabes invertidos. La tasa de conversión fue alta, al inicio en 100%. Después de 3 días de operación continua las conversiones fueron todavía mayores al 80%. Adicionalmente, debido a las propiedades de intercambio iónico de las perlas de quitosán o Chitopearl™, el jarabe invertido resultante fue casi claro cristal (L=66.14, a*= 0.39, b*= 2.11). No se observó una substancial caída en presión cuando se incremento la concentración de azúcar debido a que el tamaño y forma de los Chitopearl™

22

1 permitió un flujo fácil a través de la columna, indicando que un jugo más concentrado puede
2 ser utilizado. A esta escala, el flujo fue fijado en el rango de 5-12 ml/min.

3 EJEMPLO 5. EFECTO DE INTERCAMBIO IONICO EN LA DECOLORACION

4 El jugo de caña microfiltrado fue pasado a través de una resina débil de intercambio aniónico
5 (Resina Whatman DE52 pre-hinchada microgranular de intercambio aniónico, Whatman,
6 New York, USA) para remover los compuestos fenólicos y proteínas.

7 Antes de ser utilizada, la resina Whatman DE52 pre-hinchada microgranular de intercambio
8 anionico exchange fue activada mediante la adición de un buffer de NaH_2PO_4 , 50 mM, pH 5
9 hasta lograr la hidratación completa. Una vez que la resina estaba hidratada y lista para
10 usarse, 40 g fueron empacados dentro de una columna plástica de 15 cm largo y 2 cm de
11 diámetro interno (50 ml de volumen de trabajo) equipada con un filtro en la parte inferior. El
12 jugo de caña microfiltrado fluyó hacia abajo a una tasa fija de 8 ml/min usando una bomba
13 peristáltica. Los compuestos coloreados presentes en 2 L del jugo microfiltrado fueron
14 removidos usando 40g de resina, dando un líquido translucido de tonalidad amarilla ligera.
15 Los parámetros de color fueron medidos con un colorímetro Minolta colorimeter usando un
16 estándar blanco y una fuente de luz D65. Los parámetros $\text{CIE L}^*a^*b^*$ (coordenadas de color
17 en el espacio) indicaron un color más luminoso de la muestra después del intercambio
18 aniónico, cambiando el valor L de 34.02 a 63.72. La coloración roja también decreció
19 con un cambio de +3.92 a -2.85 en los valores de a^* . Esta columna fue regenerada usando 2
20 volúmenes de cama o lecho (100 ml) de una solución 1 N de NaOH seguido de 2 volúmenes
21 de cama de agua desmineralizada 2 volúmenes de cama de un buffer de NaH_2PO_4 50 mM,
22 pH 5. El NaOH residual (100 ml, 1.0 N) fue eliminado por neutralización con ácido HCl 1
23 N.

24 EJEMPLO 6: CONVERSION DE SACAROSA EN ESCALA PILOTO.

25 La invertasa fue inmovilizada en ChitopearlTM tal como se describió en el Ejemplo 2 y
26 empacada en una columna de vidrio equipada con una chaqueta intercambiadora de calor y
27 con tapas permeables en ambas terminaciones de la columna de 70-cm de largo y 7-cm de
28 diámetro interno (2700 ml de volumen de trabajo). Antes de su uso, un buffer 50 mM de
29 NaH_2PO_4 , pH 5 fue pasado a través de la columna hasta que la solución saliente tuviera un

7

pH de 5. La temperatura de operación fue fijada en 60°C mediante el uso de agua caliente. El jugo inicial fue desviado hasta que estuviera estable. El sistema fue probado primero con una solución de sacarosa de 32° Brix a 9.6 L/hr usando una bomba de centrifuga (Fasco, Model 71632363). Con un tiempo de residencia de 14 segundos, la conversión promedio total fue de 96.0%. La concentración de fructosa y glucosa en el jarabe invertido fue determinada con el método colorimétrico de ácido dinitrosalivílico (DNS) reportado por Miller (1959). G.L. Anal Chem., 1959, 31: 426-428.

EJEMPLO 7: PRODUCCION DE JARABE INVERTIDO DE JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR A ESCALA PILOTO SIN PASTEURIZACIÓN O ULTRAFILTRACIÓN

El jugo de caña de azúcar fue extraído con técnicas convencionales que consisten de la maceración de la caña de azúcar en un molino de impacto mecánico. Durante las pruebas, el jugo crudo de la caña de azúcar (guarapo) fue manualmente pasado a través de la malla No. 100 (equivalente Tyler 100) en lotes de 2 L para el objeto de remover partículas sólidas gruesas que pueden afectar en las otras etapas del proceso. Los sólidos (incluyendo cenizas, piedras y material orgánico) fue retenido por la malla mientras que el jugo prefiltrado paso a través de la malla y fue colectado en tanques para proseguir con el proceso. Este Ejemplo está también ilustrado en la Fig. 2 pero no se realizó ni pasteurización ni el paso opcional de concentración (no se efectuó el paso 22). Los números de referencia de las varias corrientes en este Ejemplo 7 no implica que las corrientes tengan las características proporcionadas en la Tabla 2 para otro distinto experimento.

El jugo primeramente filtrado fue posteriormente filtrado finamente a través de una membrana de microfiltración (Amersham Biosciences, CFP-2-E-6A) equipado con una bomba (E-Trac WFCIT AC Inverter). La unidad consistió de una membrana de microfiltración de 2800 cm² de 0.2 µm. Las presiones de entrada y salida fueron mantenidas en 13 y 0 psi, respectivamente y la velocidad de la bomba mantenida a 200 RPM. Bajo estas condiciones, el flujo a través del cartucho fue de 900 L/hr, mientras que el jugo de caña de azúcar retenido (4001) tuvo un flujo de 895.2 L/hr, el cual fue recirculado al tanque almacenador de donde el jugo era obtenido. El jugo de caña de azúcar microfiltrado (4002) tuvo un flujo promedio de 4.8 L/hr y fue colectado en tanques de almacenamiento para procesarse posteriormente. Después de su uso, la membrana requirió ser lavada con 20 L de

22

NaOH 0.2 N a 50°C esto con el objeto de remover a los solidos adheridos a la superficie y para fines de sanitización. El NaOH (20, 0.2 N) residual fue eliminado por neutralización con 4 L de HCl 1 N. El equipo de microfiltración no tuvo suficiente capacidad, y por lo tanto una unidad más grande debió ser utilizada. Pero esto es cuestión de optimización, dentro de las destrezas del arte.

El jugo de caña de azúcar microfiltrado (4002) pasa hacia abajo a través de una columna de vidrio de 70 cm de largo y 7 cm de diámetro interno empacada con resina Whatman DE52 (1350 cc de volumen de trabajo) previamente tratada tal como se describe en el Ejemplo 5. El jugo microfiltrado (4002) fue bombeado por la acción de una bomba peristáltica (Stenner 17013M5) a un flujo promedio de 1.1 l/hr, produciendo un líquido insólido de color amarillo ligero (5001) a la salida de la unidad que fue recolectado en unques de almacenamiento para seguir con el proceso. Los cambios colorimétricos en el jugo de caña de azúcar fueron determinados usando la escala CIELa*b* (Colorímetro Minolta), dando los siguientes parametros : L* 41.7, a* +6.75, b* +24.42 en el jugo de entrada y L* 61.17, a* -1.52, b* +14.94 en la salida.

El tiempo de operación dependió del contenido de fenólicos de la caña de azúcar y de la compresión en la columna causada por la resina debido a caídas en diferencias de presión del jugo fluyendo desde arriba hacia abajo. Esto indica la necesidad de optimizar el tipo de resina, posiblemente cambiando hacia una más eficiente: los candidatos son Dowex 66 de Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A. o aún ChitopearlTM, empleadas en el paso de conversión, las cuales tienen capacidad de intercambio iónico y que son capaces de soportar la presión de la columna de una mejor manera. El tiempo de operación usando las condiciones aquí descritas fue de 5 horas, mayores tiempos de operación produjeron productos con mayores cantidades de compuestos fenólicos debido a la progresiva pérdida de capacidad de intercambio de la resina, afectando las propiedades ópticas. Algunas columnas aniónicas pueden ser usadas para operarse en base semicontinua, cambiando de una a otra una vez que el nivel de saturación de la resina se alcanza. La saturación de la resina puede ser determinado indirectamente mediante la medición de parametros de color CIELa*b* en el producto eluyente de salida. Después de que la resina ha perdido la mayoría de su capacidad

175

de intercambio iónico debido a la saturación con compuestos fenólicos es regenerada con NaOH 1.0 N tal como se describe en el Ejemplo 3.

El jugo tratado con intercambio iónico (S001) fue pasado a través de una columna de conversión enzimática (27) descrita en el Ejemplo 6. El jugo de caña de azúcar tratado con intercambio fluyó hacia arriba por la acción de una bomba ajustable centrífuga (Fasco, Model 71632363). Cuando el flujo de jugo de caña de azúcar que fluyó a través de la columna fue fijado a 12 L/hr (con un tiempo de residencia de 10.5 segundos), la conversión promedio total fue de 89.7 %, y cuando fue fijado a 6 L/hr (con un tiempo de residencia de 21 segundos), la conversión promedio total fue de 98.0 %. El jarabe invertido fue colectado en tanques de almacenamiento para procesarse posteriormente.

Después de la conversión, el jarabe invertido (7001) puede ser concentrado utilizando un evaporador equipado con una bomba de vacío. El evaporador puede ser cargado con el jarabe invertido con 20° Brix hasta que el volumen operacional sea alcanzado. Después de cargarlo, el evaporador de lotes es cerrado y encendido. El evaporador se reguló a operar a una temperatura promedio de 55°C y a una presión de -11.9 hars que se alcanza en un cierto periodo de tiempo de acuerdo a las características del evaporador. El flujo del jarabe invertido en la entrada debe ser ajustado automáticamente por el sistema de control del evaporador al mismo tiempo que el agua condensada sale a un flujo determinado. El jarabe invertido dentro del evaporador se concentrará hasta alcanzar 70° Brix. La concentración de azúcar (°Brix) se determina con un refractómetro (tal como el SPER SCIENTIFIC, 0% 810%).

En su principal incorporación, la invención incluye el paso de convertir el jugo/concentrado de la caña de azúcar (preferentemente libre de contaminantes, como se bosqueja arriba, usando cuando menos dos etapas de filtración que combinadas eliminan a contaminantes mayores de 0.2µm y preferentemente aún partículas más grandes de 0.005µm) usando invertasa inmovilizada, colocada en un reactor de lecho empacado (fijo, móvil o fluidizado).

26

Existen varios reportes (Akgol et al., 2001, Bahar y Tuncel 2002, D'Souza y Goulbole 2002, Tanriseven y Dogan 2001, Tunturk et al., 2000 y Torres et al., 2003) que muestran diferentes maneras para inmovilizar a la invertasa en distintos soportes. Cualquiera de los previos en principio pueden ser utilizados sujetos a limitaciones por costo. Técnicas adicionales de inmovilización y soportes son bien conocidas y descritas en literatura de parentesis revisados en la sección de antecedentes.

Existe una gran variedad de soportes de inmovilización basados en adsorción, atrapamiento, encapsulación, intercambio iónico, entrecruzamiento y enlace covalente. Los sistemas de soporte más ampliamente utilizados emplean agar, alginatos, quitosán, polímeros variados, poliacrilamida, celulosa, celulosa sustituida, pectina, carbón y alumina (Akgol et al., 2001, Bahar y Tuncel 2002, D'Souza y Goulbole 2002, Rosevear 1984, Tanriseven y Dogan 2001 y Tunturk et al., 2000) como material de soporte. El glutaraldehído y polidileneimina son los agentes más efectivos para inmovilizar enzimas en soportes sólidos y para cargar a las mismas en las columnas (Avramescu et al., 1969 y Torres et al., 2003).

Existen diferentes fuentes de invertasa con distintos grados de actividad. La invertasa ha sido exitosamente inmovilizada en diferentes sistemas. La invertasa de levadura grado VII con una actividad específica de 2000 IU/g es preferida. Es importante optimizar las condiciones para hacer más eficiente el uso del reactor enzimático. Los parámetros de proceso que deben ser principalmente considerados son las condiciones operacionales de temperatura y pH. Un rango de temperatura preferido es de 45-60° C y un rango de pH preferido es de 4.5-6.0. La temperatura óptima es de 50°C y pH 4.5. Los soportes preferidos son alumina, quitosán, y acrilamidas los cuales tienen los siguientes rangos de características: tamaño 350 – 590 µm y superficie específica 150 – 200 m²/g.

Con el propósito de demostrar la efectividad de la invención tres diferentes sistemas de inmovilización fueron probados: atrapamiento, adsorción y entrecruzamiento. La técnica de inmovilización mediante adsorción es la más sencilla. Opcionalmente, el producto de jarabe invertido puede ser concentrado aún más lo cual puede ser logrado por evaporación convencional para llegar al menos 68° Brx y/o refinado aún más, si es necesario para

2A

1 remover la proteína residual, fenólicos y compuestos coloreados indeseable por adsorción en
2 una columna aniónica con las condiciones tales como se describieron arriba y/o una columna
3 de carbón activado.

4 El proceso entero puede ser escalado y automatizado con equipos actuales de automatización
5 e instrumentación. Entre las ventajas del presente proceso están: (i) la habilidad de operar en
6 una línea de proceso completamente continua empezando con el extracto crudo extraído de
7 caña y terminando con el producto de jarabe invertido; (ii) la habilidad de operar usando un
8 reducido número de operaciones unitarias y/o operaciones unitarias más eficientes para
9 lograr producir jarabe invertido. En otras palabras, mientras en principio es posible obtener
10 azúcar refinada de mesa, disolverla en agua y cargarla en un reactor de inversión
11 inmovilizada para convertirla en jarabe invertido, el costo total de ese proceso (costo de
12 refinación del azúcar de mesa más el costo de convertirla en jarabe invertido) sería
13 desfavorable, o inclusive prohibitivo. Similarmente, mientras es posible añadir pasos
14 convencionales de refinación para pretutar el jugo de caña de azúcar antes de su entrada a la
15 operación de remoción de sólidos/solubles descritos aquí, este pretratamiento no es necesario
16 y su adición debe ser balanceado contra el incremento en costo para realizarlo y el beneficio
17 derivado de él.

18 A pesar de que la presente invención se ha demostrado y descrito con respecto a sus
19 modalidades preferidas y que varios cambios y modificaciones, pudieran hacerse evidentes a
20 una persona entrenada en el estado de arte en el cual pertenece esta invención, se consideran
21 que esas caen dentro del espíritu y alcance de esta invención, tal como se reclama abajo.
22 Todos los documentos citados y listados abajo han sido incorporados por referencia
23 enteramente (excluyendo a sitios electrónicos de la red).

Referencias

- Akgol, S., Kavar, Y., Denizli, A., and Arica, M.Y. Hydrolysis of sucrose by Invertase immobilized onto novel magnetic poly (vinyl alcohol) microspheres. *Food Chem.* 74:281-288, 2001.
- Avrameas et al. The cross linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immuno-adsorbents. *Immunochemistry* 6:53-66, 1969.
- Bakar, T., and Tuncel, A. Immobilization of invertase onto cross linked poly(p-chloromethyl styrene) beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 83:1268-1279, 2002.
- Clarke, M.A., and Godshall, M.A. Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane. Sugar Series 9, Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam, Netherlands. pp. 265-291, 1988.
- Donovan, M. Sugar. In: Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Vol. 7., R. Marne, R. Robinson, and M. Sadler (eds.) Academic Press, London, UK, pp. 4441-4464, 1993.
- D'Souza, S.F., and Godbole, S.S. Immobilization of invertase on rice husks using polyethylenimine. *J. Biochem. Biophys. Methods* 52:59-62, 2002.
- Food Agriculture Organization. <http://apps.fao.org/>, 2003.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.L., and David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biological Chemistry* 177:751-765, 1949.
- Messing, R. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Academic Press, New York, NY, USA, Chap 1 and 2, p1-38, 1975.
- Kasumi T., Tsuji, Hayashi K., and Tsumura N., *Agr. Biol. Chem.*, 41 (10), 1977 (RECD 1978) 1865-1872.
- Rosevear, A. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34(3):127-150, 1984.
- Swain, T., and Hillis, W.B. The phenolics constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68, 1959.
- Tanriseven, A., and Dugan, S. 2001. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Proc. Biochem.* 36:1081-1083, 2001.

22

Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J.M., Oriz, C., Fernandez Lafuente, R., Guisan, J.M., Tam, A., and Daminati, M. Reversible immobilization of invertase on sebacic acid coated with polyethylencimine: optimization of the biocatalyst's stability. *Biotechnology Progress* 18(6):1221-1226, 2002.

Tsumura N., Kasumi T., and Ishikawa M. Immobilization of glucose isomerase in microbial-cells. *Starch/ Staerke* 30: 420-423, 1978.

Tumturk, T., Arslan, F., Disli, A., and Tufan, Y. Immobilization of invertase attached to a granular dimer acid-co-alkyl polyamine. *Food Chem.* 69:5-9, 2000.

Miller, G.L., *Anal. Chem.*, 1959, 31: 426-428, 1959.

Hsieh, H.J., Liu, P.Ch, Liao, W.J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters*. 22: 1459-1464, 2000.

1

70

Tabla 1. Características del jugo de caña de azúcar secuencialmente purificado con microfiltración, ultrafiltración y resinas de intercambio aniónicas. n.m. = no medido por un método analítico

	Jugo de Caña de Azúcar				
	Cruído	Microfiltrado Membrana 0.2µ	Ultrafiltrado (0,000 MWCO)	Columna Intercambio Aniónico	Columna de Inversión
Índice de Extracción de Sacarosa					
Índice de Refracción	18.2	17.7	16.3	16.0	n.m.
Rotación Específica	69.3	67.4	61.5	60.3	n.m.
Conductividad (milimhos)	1.56	1.02	1.58	1.50	n.m.
Pot/Índice de Extracción	16.8	16.4	15.0	15.0	n.m.
Pureza	92.4	92.5	92.2	92.1	n.m.
Color^a					
a*	1.03	3.16	2.42	- 1.23	n.m.
b*	5.19	29.17	34.72	7.85	n.m.
L	25.18	51.81	56.65	65.73	n.m.
E	25.72	59.54	61.85	66.30	n.m.
Tonalidad (hue)	78.9	83.9	84.4	98.8	n.m.
Composición Química					
pH	5.46	5.49	5.51	5.69	5.60
Cenizas (%)	0.37	0.31	0.23	0.08	0.26
Proteína (ppm)	778	77	50	15	59
Fenólicos	532.96	436.50	353.45	130.85	436

^a L = Luminosidad; a* (+) = color rojo; a* (-) = color verde; b* (+) = amarillo; b* (-) = azul; E (índice de color) = (L² + a² + b²)^{1/2}

3

(ppm)					
Azúcares Reducibles (g/l)	9.25	8.78	8.68	8.69	n.m.
Sacarosa (g/l)	202.26	179.47	176.20	173.41	13.75
Glucosa (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	79.85
Fructosa (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	79.85

23

1 **Tabla 2. Características del jugo de caña de azúcar secuencialmente purificado mediante**
 2 **filtración de partículas, microfiltración, y intercambio aniónico. n.m. = no medido por un**
 3 **método analítico**

Jugo de Caña de Azúcar					
	Crudo	Filtrado Partícula 100 mesh	Microfiltrado Membrana 0.2µ (Producto Intermedio)	Columna Intercambio Aniónico	Columna Invertasa
Índice de Extracción de Sacarosa					
Índice de Refracción	18.2	18.2	18.2	18.2	n.m.
Rotación Específica	69.3	68 - 69	67.4	60.3	n.m.
Conductividad (milimhos)	1.56	1.56	1.62	1.50	n.m.
Pot/Índice Extracción	16.8	16.8	16.4	15.0	n.m.
Pureza	92.4	92.4	92.5	92.1	n.m.
Color ^b					
a*	1.03	1-3	6.75	- 1.52	0.39
b*	5.19	6-28	24.42	14.94	2.11
L	25.18	26-50	41.7	61.17	66.14
E	25.72	26-50	48.79	62.99	66.17
Tonalidad (huc)	78.9	80+2	73.95	95.84	79.34
Composición Química					
PH	5.48	5.48	5.49	5.60	5.61
Cenizas (%)	0.37	0.37	0.31	0.08	0.26
Proteína (ppm)	778	Menos de 778	77	15	50
Fenólicos (ppm)	532.96	Menos de 532	436.50	130.85	436

^b L = Luminosidad; a* (+) = color rojo; a* (-) = color verde; b* (+) = amarillo; b* (-) = azul; E (Índice de color) = (L² + a² + b²)^{0.5}

77

Azúcares	9.25	9.10	9.15	9.20	
Reductores (g/l)					
Sacarosa (g/l)	202	195	193	190	19
Glucosa (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	85.5
Fructosa (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	85.5

24

LAS REINVIDICACIONES QUE RECLAMAMOS SON:

1. Un método para producir un jarabe invertido a partir de jugo crudo de caña de azúcar (guarapo) que comprende los siguientes pasos:

(a) someter al jugo de caña de azúcar a microfiltración para remover una primera fracción de contaminantes sólidos del dicho jugo produciendo un jugo de caña microfiltrado;

(b) someter al jugo de caña microfiltrado a ultrafiltración para remover una segunda fracción de contaminantes sólidos del dicho jugo microfiltrado y una primera fracción de contaminantes solubles de dicho jugo microfiltrado y y así produciendo un jugo de caña ultrafiltrado;

(c) pasar el jugo de caña ultrafiltrado a través de una columna de intercambio aniónico para remover una segunda fracción de contaminantes solubles de dicho jugo de caña ultrafiltrado, y por consiguiente producir un jugo tratado en una columna de intercambio aniónico;

(d) contactar dicho jugo de caña tratado con resinas de intercambio aniónico con la enzima invertasa inmovilizada para convertir cuando menos el 90% de la sacarosa contenida en dicho jugo tratado en una mezcla de glucosa y fructosa y por consiguiente producir así dicho jarabe invertido.

2. El método de la reivindicación 1 donde el paso (c) es repetido cuando menos una vez antes de proceder al paso (d).

3. El método de la reivindicación 1 que además comprende el paso de:

(e) concentrar dicho jugo tratado con la resina de intercambio aniónica antes de proceder al paso (d).

17

4. El método de la reivindicación 2 que además comprende el paso de:

(e) concentrar dicho jugo tratado con la resina de intercambio aniónica antes de proceder al paso (d).

5. El método de la reivindicación 4 donde el paso (c) es llevado a cabo inmediatamente después de realizar una vez el paso (c).

6. El método de la reivindicación 1 donde el jugo de caña de azúcar sujeto a una microfiltración como en el paso (a) es jugo crudo de caña no sujeto a ningunas etapas del procesamiento después de la extracción de la caña de azúcar y antes del paso (a).

7. El método de la reivindicación 1 donde el jugo de caña de azúcar es sujeto a una microfiltración en dicho paso (a) ha sido sujeto solamente a sedimentación o centrifugación después de su extracción de la caña de azúcar para remover sólidos gruesos.

8. El método de la reivindicación 1 que además comprende el paso de:

(f) refinación adicional del jarabe invertido producido en el paso (d).

9. El método de la reivindicación 1 que además comprende el paso de:

(g) concentración del jarabe invertido producido como en el dicho paso (d).

10. El método de la reivindicación 1 que además comprende los pasos de:

(h) concentración del jarabe invertido producido en dicho paso (d); y

(i) refinación adicional del jarabe invertido producido en dicho paso (d).

136

11. El método de la reivindicación 1 donde el jugo de caña de azúcar que fue sujeto al paso (a) que tiene un contenido de azúcar entre aproximadamente 16 y 23° Brix de los cuales cuando menos el 90% es sacarosa.

12. El método de la reivindicación 11 donde el jarabe invertido producido en el paso (d) tiene un contenido de azúcar entre 50° a 70° Brix del cual cuando menos el 90% es una mezcla de fructosa y glucosa.

13. El método de la reivindicación 11 donde, antes de ser sujeto al dicho paso (d), el jugo tratado con la resina de intercambio aniónica tiene un contenido de sólidos no mayor que aproximadamente 1%, basado en el contenido de azúcar; un contenido de fenólicos no mayor que aproximadamente 130 ppm; un contenido de proteína no mayor que aproximadamente 15 ppm; y un contenido de minerales no mayor que aproximadamente 0.08%, basado en el contenido de azúcar.

14. El método de la reivindicación 3 donde el jugo concentrado y tratado con la resina de intercambio aniónica contiene aproximadamente 50° Brix; antes de ser sujeto al dicho paso (d).

15. El método de la reivindicación 1 donde en el paso (c) se refluja una porción del jugo tratado con la resina de intercambio aniónica concentrándose antes de ser regresado a la columna de intercambio aniónica.

16. El método de la reivindicación 1 donde el dicho paso (d) se lleva a cabo bajo condiciones controladas de pH y temperatura.

17. El método de la reivindicación 1 donde cuando menos uno de los pasos de (a) hasta (d) es llevado a cabo como operación unitaria continua.

18. El método de la reivindicación 17 donde todos los dichos pasos de (a) hasta (d) son llevados a cabo como operaciones unitarias continuas.

37

1 19. Un método para la producción de jarabe invertido partiendo de jugo
2 crudo de caña de azúcar (guarapo) que comprende los pasos de:

3 (a) someter el jugo de caña de azúcar a una primera filtración para remover
4 una primera fracción de contaminantes sólidos de dicho jugo y así producir un jugo de caña
5 de primera filtración;

6 (b) someter al primer jugo de caña de primera filtración a una filtración mas
7 fina para remover una segunda fracción de sólidos contaminantes de dicho jugo de primera
8 filtración y remover una primera fracción de contaminantes solubles de dicho jugo de
9 primera filtración y por consiguiente producir un jugo de caña más finamente filtrado;

10 (c) pasar el jugo de caña más finamente filtrado a través de una columna de
11 intercambio aniónico para remover una segunda fracción de contaminantes solubles de
12 dicho jugo de caña más finamente filtrado, así produciendo un jugo de caña tratado con
13 resinas de intercambio aniónico;

14 (d) contactar dicho jugo de caña tratado con resinas de intercambio aniónico
15 con invertasa inmovilizada para convertir cuando menos el 90% de la sacarosa en el dicho
16 jugo tratado en glucosa y fructosa y por consiguiente producir un jarabe invertido.

17 20. El método de la reivindicación 19 donde el paso (c) es repetido cuando
18 menos una vez antes de proceder al paso (d).

19 21. El método de la reivindicación 19 que además comprende el paso de:

20 (e) concentrar el dicho jugo tratado con la resina de intercambio aniónico
21 antes de proceder al paso (d).

22 22. El método de la reivindicación 19 donde el jugo de caña de azúcar
23 primeramente filtrado en el dicho paso (a) ha sido sujeto solamente a un paso de

170

1 sedimentación o centrifugación después de su extracción de la caña de azúcar para remover
2 sólidos gruesos.

3 23. El método de la reivindicación 19 que además comprende el paso de:

4 (f) refinación adicional del jarabe invertido producido en el dicho paso (d).

5 24. El método de la reivindicación 19 que además comprende el paso (g)
6 concentrar el jarabe invertido como en el paso (d).

7 25. El método de la reivindicación 19 donde el jugo de caña de azúcar
8 sujeto al paso dicho paso (a) tiene un contenido de azúcar entre 16° y 23° Brix del cual
9 cuando menos el 90% es sacarosa y donde el jarabe invertido producido en el paso dicho
10 (d) tiene un contenido de azúcar entre 50° a 70° Brix del cual al menos 90% es una mezcla
11 de fructuosa y glucosa.

12 26. El método de la reivindicación 25 donde, antes de ser sujeto al paso
13 (d), el jugo tratado con la resina de intercambio aniónico tiene un contenido de sólidos no
14 mayor que aproximadamente 1%, basado en el contenido de azúcar; un contenido de
15 fenólicos no mayor que aproximadamente 130 ppm; un contenido proteico no mayor que
16 aproximadamente 15 ppm; y un contenido de minerales no mayor que aproximadamente
17 0.08%, basado en el contenido de azúcar.

18 27. El método de la reivindicación 21 donde el jugo concentrado y tratado
19 con la resina de intercambio aniónica tiene un contenido de azúcar de aproximadamente 40
20 a 50° Brix; antes de ser sujeto al dicho paso (d).

21 28. El método de la reivindicación 19 donde en el dicho paso (c) una
22 porción refluída del jugo tratado con la resina de intercambio aniónico se concentra antes
23 de ser regresada a la columna de intercambio aniónico.



1 29. El método de la reivindicación 19 donde el dicho paso (d) es llevado a
2 cabo bajo condiciones controladas de pH y temperatura.

3 30. El método de la reivindicación 19 donde cuando menos uno de los
4 pasos (a) hasta (d) son llevados a cabo en operación unitaria continua.

5 31. El método de la reivindicación 19 donde el primer paso de filtración
6 (a) comprende pasar dicho jugo de caña a través de un filtro de partículas provisto con una
7 malla no mayor de Malla US (100 Tyler).

8 32. El método de la reivindicación 31 donde por decir el paso de filtración
9 fina (b) incluye microfiltración.

10 33. El método de la reivindicación 19 donde el dicho paso de primera
11 filtración (a) comprende microfiltración.

12 34. El método de la reivindicación 33 donde el dicho paso de filtración fina
13 comprende ultrafiltración teniendo un límite retentivo de peso molecular de 10,000 Da.

14 35. El método de la reivindicación 19 que adicionalmente comprende el
15 paso de:

16 (j) concentrar evaporativamente al intervalo de 35° a 55° Brix el dicho jugo
17 de caña de azúcar filtrado del paso (a) previo al paso (b).

18 36. El método de la reivindicación 35 donde el paso (j) es realizado a una
19 temperatura de pasteurización entre aproximadamente 61.5° y 72° C por un tiempo
20 suficiente para pasteurizar al jugo resultante de la primera filtración.

21 37. El método de la reivindicación 35 donde el dicho paso (a) comprende
22 filtración de partículas y el paso (b) comprende microfiltración.

4-2

38. El método de la reivindicación 19 donde el paso (a) comprende filtración de partículas y el paso (b) comprende microfiltración.

39. El método de la reivindicación 19 donde el paso (a) comprende filtración de partículas y el paso (b) comprende microfiltración seguida de ultrafiltración.

40. Un método para producir un jarabe invertido de jugo crudo de caña de azúcar (guarapo) que comprende los pasos de:

(i) someter al jugo de caña de azúcar a un proceso de filtración de cuando menos dos etapas, una primera etapa y una etapa más fina, para remover contaminantes mientras substancialmente se mantienen los azúcares presentes en el jugo.

(ii) someter el jugo filtrado de caña de azúcar a intercambio aniónico para remover contaminantes solubles del dicho jugo filtrado de la caña de azúcar que no fueron removidos en el proceso de filtración, por consiguiente produciendo un jugo de caña tratado mediante intercambio aniónico;

(iii) poner en contacto al dicho jugo tratado mediante intercambio aniónicas con invertasa enzima inmovilizada para convertir cuando menos 90% de la sacarosa contenida en el jugo tratado y así producir una mezcla de glucosa y fructosa y por consiguiente producir un jarabe invertido.

41

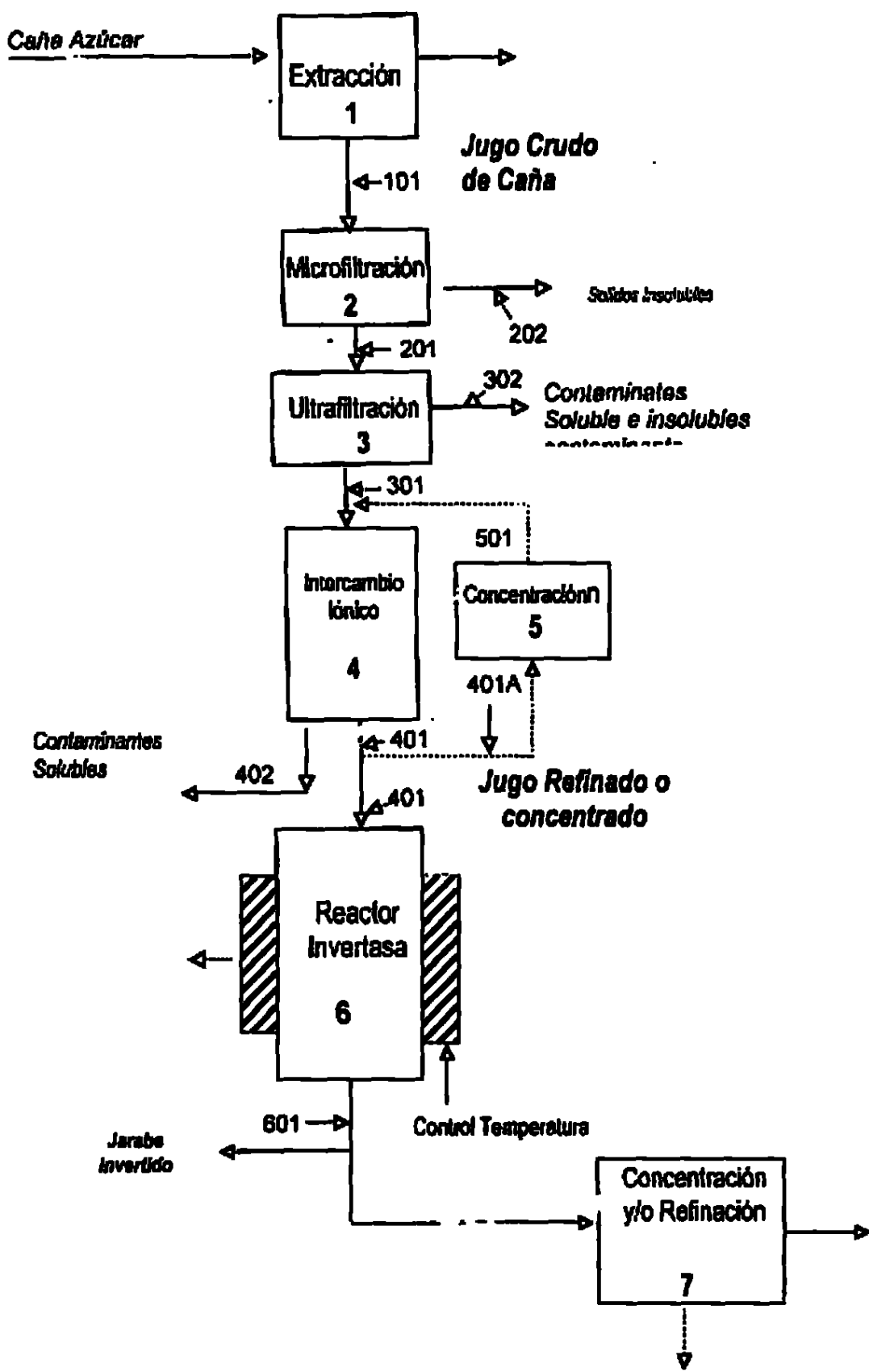
PRODUCCION DE JARABE INVERTIDO DE JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR USANDO INVERTASA INMOBILIZADA

RESUMEN

Esta invención se enfoca en un proceso nuevo en el cual el jugo de caña de azúcar (guarapo) es primeramente refinado a través de un número de pasos y posteriormente biocenzimáticamente convertido en un jarabe refinado invertido o una solución concentrada de glucosa-fructosa usando un reactor empacado con invertasa inmovilizada. Los pasos de refinación preferentemente incluyen una primera filtración (filtración de partículas o microfiltración) seguido de una segunda filtración (microfiltración o ultrafiltración) y posteriormente cuando menos un paso a través de una columna empacada con una resina de intercambio aniónico. El jugo refinado de caña de azúcar puede ser opcionalmente concentrado y/o pasteurizado antes de pasarlo a través de un reactor empacado con invertasa inmovilizada para convertir a la sacarosa en fructosa y glucosa.

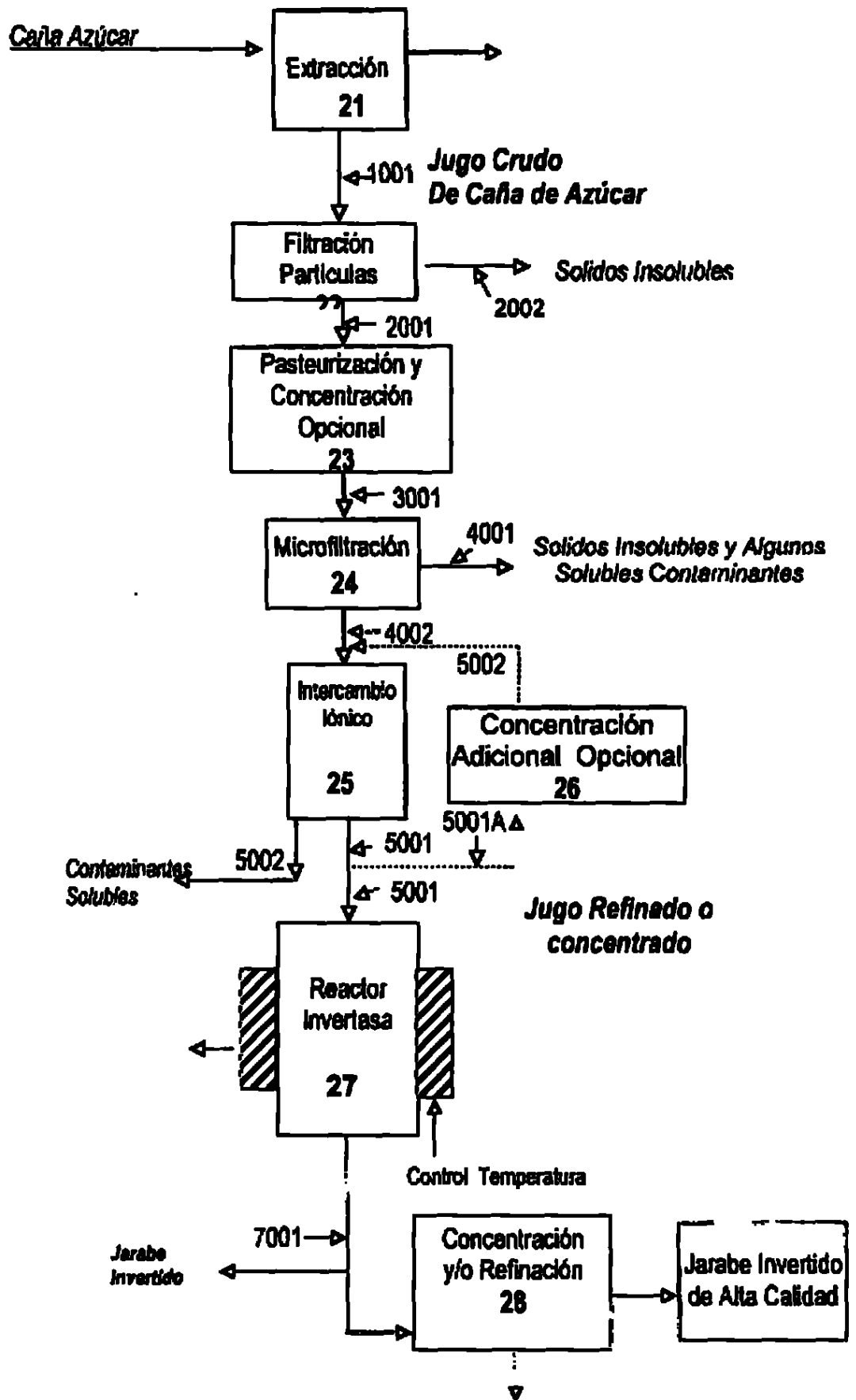
2A

FIG 1



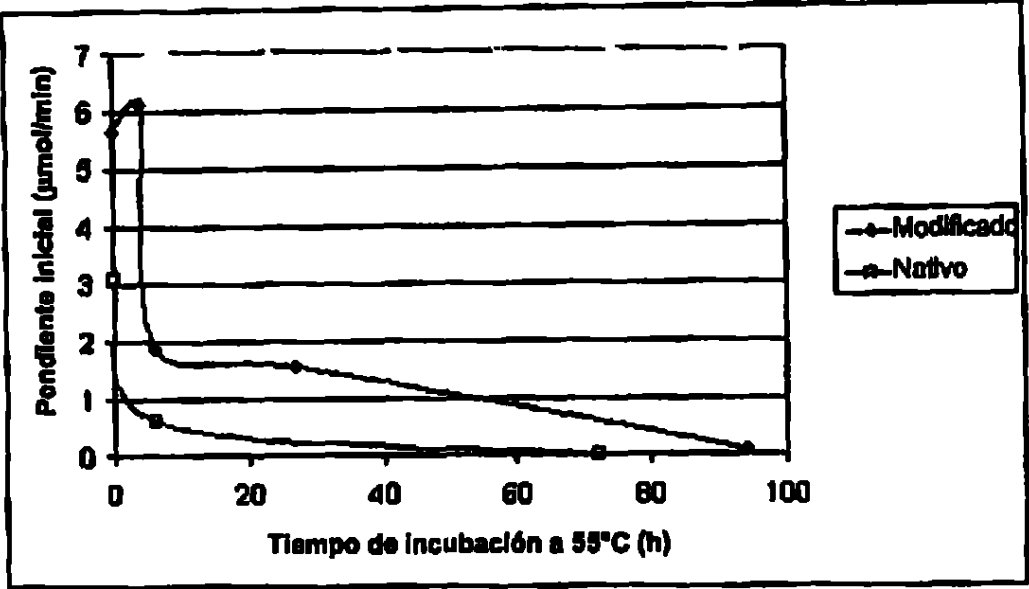
23

FIG 2



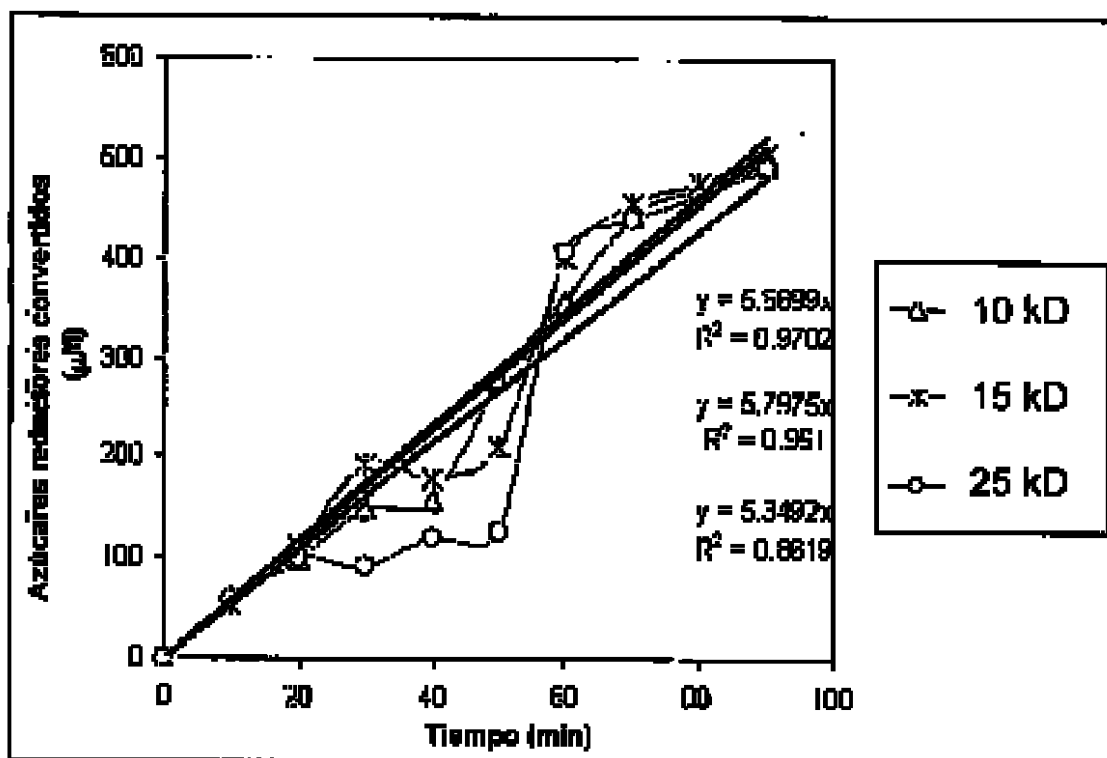
44

FIG 3



2
3
4
5
6
7
8

FIG 4



Extracto de pub. 46



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	☒
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	☒
-Descripción de la invención.	()	☒
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	☒
COMPLETA ☒ INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra de muestra que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () () ()

Firma responsable:

Fecha:

X¹⁰
47

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a) .
CASTILLO GRAU GERMAN

REFERENCIA	Radicación No.	6 39073
	Solicitud internacional	IB2004/003163
	Fecha inicio fase nacional	02/05/2005
	Trámite	11
	Evato	378
	Actuación	430
	Oficio No.	4 6330

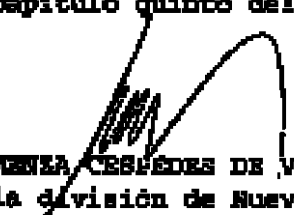
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCP), regla 51 bis del Reglamento y Circular Único de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 61 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 19 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal c), del capítulo quinto del título primero de la Circular Único No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefa de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 JUN. 2006
adpali

~~6/06/006~~