



328684

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud  
de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 5 de Julio de 1966, con el número 328.684

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S, entidad danesa establecida en 115, Fuglebakkevej, Copenhague, Dinamarca, por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE AMILOGLUCOSIDASA"

=====

5 Es conocida la sustitución de la hidrólisis ácida convencional del almidón por una descomposición enzimática. En particular, tal procedimiento enzimático ha sido empleado en la preparación de dextrosa cristalina. Es de importancia considerable que la conversión en dextrosa se lleve a cabo hasta el grado en que sea posible, porque la dextrina, no hidrolizada inhibe la cristalización de la dextrosa y hace disminuir su producción.

La amiloglucosidasa se ha empleado como enzima ac-

328684<sup>2</sup>



5  
10

tiva para descomponer el almidón. Esta enzima es capaz de llevar a cabo una descomposición completa del almidón hasta dextrosa, aunque los enlaces alfa-1,6-glucosídicos se rompen considerablemente más lentamente que los enlaces alfa-1,4-glucosídicos. Sin embargo, muchos microorganismos que son capaces de producir amiloglucosidasa, producen también la transferasa llamada Transglucosidasa, que es activa en la transferencia de moléculas de dextrosa con enlaces alfa-1,4- a moléculas de dextrosa con enlaces alfa-1,6, con maltosa, por ejemplo, este efecto da como resultado la producción de isomaltosa y otros oligosacáridos.

15  
20

Se ha llevado a cabo una hidrólisis enzimática del almidón empleando enzimas derivadas de las especies: Rhizopus, Endomyces fibuliger y Aspergillus. La especie Rhizopus forma una amiloglucosidasa pura, pero tiene que desarrollarse en cultivos superficiales que son poco atractivos para la producción industrial de amiloglucosidasa, debido a los elevados costes de trabajo inherentes a este procedimiento. El Endomyces fibuliger puede usarse en operaciones de desarrollo sumergido, pero no da rendimientos aprovechables comercialmente de amiloglucosidasa.

25  
30

Las especies de Aspergillus son muy adecuadas para la producción de amiloglucosidasa en escala comercial por medio de un desarrollo sumergido. No obstante, todas las especies Aspergillus conocidas producen, además de amiloglucosidasa, mayor o menor cantidad de transglucosidasa. Por las razones mencionadas anteriormente, es muy deseable separar esta última enzima de la preparación de enzima obtenida, antes de emplearla en la hidrólisis del almidón con el objeto de preparar dextrosa, y se han sugerido va-

328684



rios métodos químicos para separar la transglucosidasa, con el fin de obtener una preparación de amiloglucosidasa pura.

5 En contraposición con el estado actual universalmente aceptado de la técnica, descrito anteriormente, se han encontrado ahora cepas de Aspergillus niger que son capaces de producir amiloglucosidasa, con rendimientos aprovechables comercialmente, sin que produzcan cantidad alguna detectable de transglucosidasa (tal y como se define posteriormente), y se ha comprobado que, por mutación de estas cepas, puede aumentarse notablemente la producción de amiloglucosidasa, sin producción simultánea de transglucosidasa.

15 Se ha comprobado también que no es absolutamente necesario alterar las condiciones de cultivo empleadas en la técnica anterior para la producción de amiloglucosidasa por cultivo de Aspergillus.

20 Así, pues, según la presente invención, se produce amiloglucosidasa adecuada para la descomposición del almidón a dextrosa, sometiendo una cepa de Aspergillus niger que no muestra producción detectable de transglucosidasa (tal y como se define posteriormente en la Memoria) a un desarrollo sumergido en un medio nutritivo.

25 En particular, se ha comprobado que las cepas que pertenecen a la especie de Aspergillus niger v. Tieghem, son especialmente útiles en la producción de amiloglucosidasa desprovista de transglucosidasa. Entre estas últimas cepas, se ha comprobado que las cepas de Aspergillus niger CBS Nos. 262.65, 263.65, 103.66, así como sus variantes  
30 o mutaciones naturales y artificiales, son particularmente

328684



adecuadas para producir grandes cantidades de amiloglucosidasa que no contiene cantidades detectables de transglucosidasa, cuando se someten a un desarrollo sumergido en un medio nutritivo.

Las cepas anteriores que se indican por medio de números CBS son mutaciones de una cepa que se aisló de una muestra de suelo o tierra vegetal recogida en Copenhague en Diciembre de 1963.

Las cepas de números CBS 262.65 y 263.65 han sido identificadas en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, de Baarn, Holanda, como pertenecientes a las especies Aspergillus niger V. Tieghem y Aspergillus niger variedad Tieghem mutante Schiemanni (Schiemann) Thom y Raper, respectivamente. La cepa número CBS 103.66 es aparentemente una mutación degenerada del Aspergillus niger v. Tieghem.

Muestras de las cepas de números CBS 262.65, 263,65 y 103.66 están en depósito en forma de cultivos restringidos en el Centraalbureau voor Schimmelcultures.

A continuación se facilita una descripción morfológica de las tres cepas anteriores (desarrollo sobre agar de Czapek Dox, temperatura de incubación, 30°C):



263.65

103.66

328684

me, pocos s, conidió no apiña-	20-25 uniforme, pocos surcos, conidió foros no apiña- dos	20-25 uniforme, pocos irregular en los bordes, conidiófo- ros no apiñados
Si asamente	Si escasamente	Si escasamente
a oscuro centro, llo claro borde llo claro.	Amarillo claro a canela, amarillo claro en el bor- de Amarillo claro	Amarillo claro a marrón  Amarillo azufre
a lar 30	Amarillo claro a canela Globular 90-180	Marrón oscuro  Globular aprox. 110
00 1 rme	500-900 7-10 1-2 Uniforme	500-800 7-11 1-2 Uniforme
lar	Globular 25-40	Globular 25-35
x 4-10 l en toda na	18-27 x 4-10 Fertil en toda la zona	9-11 x 4-5 Fertil en toda la zona
x 2-3,5	7-12 x 2-3,5	7-11 x 2
lar n cs	Globular Amarillo claro/canela 3-5 Asperos	Globular Marrón 3-5 Asperos
tes	Ausentes	Ausentes

328684

28



El presente método para preparar amiloglucosidasa que no contiene cantidades detectables de transglucosidasa, se describe con más detalle a continuación:

El hongo se almacena en forma liofilizada. Se liofiliza a partir de agar de Czapek Dox, cuya composición se indica más adelante. El sustrato de liofilización es leche. El cultivo liofilizado se mezcla en un matraz de Fernbach con agar Czapek Dox y se incuba a 30°C hasta que tiene lugar la esporulación. Las esporas se ponen en suspensión en agua estéril y se transfieren asépticamente a un depósito de inoculación de 100 litros que contiene un medio de maíz molido (20-25%) y  $\text{NO}_3\text{K}$  (1%). Se inician la agitación (200-400 rpm) y la aireación (1 vol, por vol, por min.) y la fermentación se lleva a cabo a 30°C hasta que hay un buen desarrollo en el depósito. Las sustancias contenidas en el depósito descrito se transfieren a un depósito de fermentación principal (2000 l.) que contiene un medio de la misma composición que el contenido del depósito de inoculación. Se inician la agitación (100-200 rpm.) y la aireación (1 vol, por vol, por min.) y la fermentación se lleva a cabo a 30°C hasta que el contenido de enzima es máximo. El pH durante la fermentación es de 4 a 5. Durante la fermentación puede añadirse un medio suplementario. Después se elimina el micelio del hongo del líquido de cultivo por filtración o centrifugación. Si se desea el líquido puede concentrarse en vacío, y pueden añadirse agentes conservadores tales como cloruro de sodio o ácido benzoico.

Si se desea un producto sólido, la amiloglucosidasa puede precipitarse con alcohol o acetona al que se ha añadido tierra de infusorios para evitar la formación de un precipitado pegajoso.

328684



En el procedimiento anterior, el agar de Czapek Dox puede sustituirse, por ejemplo, por agar E. Los dos medios tienen las composiciones siguientes:

	<u>Agar de Czapek Dox</u>		<u>Sustrato E</u>	
$\text{NO}_3\text{Na}$	3 g	por litro	Peptona	6 g por l
$\text{PO}_4\text{HX}_2$	1 g	por litro	Caseina digerida con tripsina	4 g "
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	"	Extracto de levadura	3 "
CLK	0,5	"	Glucosa	1 "
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	"	Extracto de carne	1,5 "
Sacarosa	30	"	Extracto de malta	20 "
			$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	20 "
Agar	15	"	Agar	40 "

La forma en que puede llevarse a cabo el procedimiento de la invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes:

#### EJEMPLO 1

En un depósito de inoculación que contenía un volumen de 100 litros, se preparó el siguiente medio:

Maiz molido	15 kg
$\text{NO}_3\text{K}$	0,750 kg
Novoamilasa bacteriana, 5000 unidades SKB/g	7,5 g
Agua	60 l aproximadamente

328684



Esta mezcla se calentó a 85°C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos aproximadamente. La mezcla se hizo hervir después durante 90 minutos a 120°C, con inyección directa de vapor de agua, de tal modo que el volumen llegó a 75 litros. Después de enfriarla a 30°C, la mezcla se inoculó con esporas de la cepa CBS 262.65, procedente de un matraz Fernbach que contenía Agar de Czapek-Dox, que había sido incubado durante 7 días a 30°C. Se iniciaron la agitación (240 rpm.) y la aireación (60 litros por minuto), y se llevó a cabo la fermentación durante 27 horas hasta que apareció un buen desarrollo del depósito. Las sustancias contenidas en el depósito se transfirieron después a un depósito de fermentación principal que contenía:

Maiz molido	240 kg
NO <sub>3</sub> K	12 kg
Novo amilasa bacteriana, 5000 unidades SKB/g.	120 g

El medio se preparó y se esterilizó de la misma manera que el medio del depósito de inoculación, y el volumen final era de 1200 litros.

Después de la inoculación, se iniciaron la agitación (350 rpm) y la aireación (1 metro cúbico por minuto), y se añadió aceite de soja cuando fué necesario, como agente contra la formación de espuma. Inicialmente el pH era de 5,65, que disminuyó a 4,2 a 4,3 durante la fermentación. Después de 100 horas de fermentación, el contenido de enzima (amiloglucosidasa) había llegado a 500 NA/ml (unidades de novoamiloglucosidasa por ml), y se añadieron, bajo

328684



condiciones estériles, 35 kg de almidón de maiz en 80 litros de agua. Se había descompuesto la suspensión por medio de 40 gramos de NOVO amilasa bacteriana, de 5000 unidades SKB/g y, se había esterilizado durante 90 minutos a 120°C. Después de 180 horas de fermentación, el contenido de enzima era de 750 NA/ml. El pH era de 4,5, y se detuvo la fermentación.

El micelio se separó por filtración y la disolución de enzima resultante era un líquido ligero de color amarillo paja claro, con un sabor ácido suave. Se comprobó que esta disolución de enzima estaba desprovista de transglucosidasa.

#### EJEMPLO 2

En un depósito de inoculación, con un volumen de 100 litros, se preparó un medio que constaba de:

Maiz molido	12 kg
Novo amilasa bacteriana, de 5000 unidades SKB/g	12 g.
NO <sub>3</sub> K	1 kg
Agua	60 l. aproximadam.

Este medio se preparó y se esterilizó como se ha explicado en el ejemplo 1. Después de enfriarlo a 30°C, el depósito se inoculó con esporas de la cepa CBS 103.66. Después de 40 horas de desarrollo en las mismas condiciones que las explicadas en el Ejemplo 1, las sustancias contenidas en el depósito se transfirieron a un depósito de fermentación principal que contenía:

328684



Almidón de maiz	60 kg
Maiz molido	240 kg
Novoamilasa bacteria- na, de 5000 unidades SKB por gramo	0,3 kg
NO <sub>3</sub> K	12 kg

El medio se preparó y se esterilizó de la misma forma que el medio del depósito de inoculación, y el volumen final era de 1200 litros.

5 Después de la inoculación se iniciaron la agitación (400 rpm) y la aireación (800 litros por minuto), y se añadió aceite de soja cuando fué necesario, como agente contra la formación de espuma.

10 El PH inicial del medio era de 5,70, y disminuyó hasta 4,1 durante la fermentación. Después de 146 horas, el contenido de enzima era de 1600 NA/ml.

El micelio se preparó por filtración y la solución de enzima resultante era un líquido de color amarillo pajá claro con un sabor ácido suave.

15 Se comprobó que esta disolución de enzima estaba desprovista de transglucosidasa.

### EJEMPLO 3

En matraces Erlenmeyer de 500 ml se esterilizaron porciones de 100 ml de un medio con la siguiente composición:

328684



Maiz molido	200 g
NO <sub>3</sub> K	10 g
Novo amilasa bacteriana de 5000 unidades SKB/g	0,4 g
Agua hasta	1 litro

5 Los matraces, que se taparon con tapones de algodón se inocularon con esporas procedentes de un plano inclinado de agar de Czapek Dox de la cepa CBS 263.65, y se incubaron en un agitador giratorio (240 rpm) durante 6 días a 30°C. El micelio se separó por filtración, y se comprobó que el filtrado contenía de 700 a 800 NA/ml. de amiloglucosidasa. La transglucosidasa no era detectable.

10 La unidad NA a que se hace referencia anteriormente se define como la cantidad de enzima que forma 1 mg de glucosa en las condiciones que se indican más adelante. El contenido de amiloglucosidasa se determina haciendo reaccionar la enzima con dextrina límite de amilasa bacteriana para formar glucosa, que después se determina por medio de oxidasa de glucosa.

15 Muestra: 0,5 ml de disolución de enzima + 0,5 ml de sustrato de destrina se dejan durante 30 minutos a 37°C. Después se añaden 3 ml de reactivo GOD, y la mezcla se deja de nuevo durante 60 minutos, después de lo cual se determina la OD (densidad óptica de 420 milimicras.

20

Muestra de comparación (para hacer ensayo en blanco): 0,5 ml de disolución de enzima + 3 ml de reactivo

328684



GOD + 0,5 ml de sustrato de dextrina se dejan a 37°C durante 60 minutos, y después se determina la OD a 420 milimicras, comparándola con la de 1 ml de agua + 3 ml de reactivo GOD.

5 Muestra normalizada: 1 ml de muestra normalizada de glucosa  
3 ml de reactivo GOD

Después de 60 minutos a 37°C se determina la OD a 420 milimicras, comparándola con la de 1 ml de agua + 3 ml de reactivo GOD. Los reactivos empleados en la determinación del contenido de aminoglucosidasa se describe detalladamente en los párrafos que siguen.

10

1. Dextrina límite de amilasa bacteriana.

15 1 kg de almidón de patata se pone en suspensión en 4 litros de agua desionizada, y 10 g de Novo amilasa bacteriana, de 5000 unidades SKB por g, se disuelven en 100 ml de agua. Se añade un ml al almidón, y la mezcla resultante se calienta a 75°C durante 10 minutos, y se enfría a  
20 50°C. Se añade el resto de la amilasa, y la mezcla déjase durante 2 horas. Después de enfriarla a 30°C, se añaden 200 g de levadura y se fermenta la mezcla durante 3 días. Se separan por destilación aproximadamente 700 ml., se ajusta  
25 el pH a 6 con NaOH N, y se añaden 10 g de concentrado de amilasa. La mezcla resultante se calienta hasta 50°C durante dos horas y se enfría hasta 30°C y, después, se añaden 200 g de

328684



5 levadura. Se lleva a cabo la fermentación durante 3 horas, y después se centrifuga la mezcla, se evapora hasta un residuo de 500 ml y se precipita con 5 partes de acetona. De esta forma se obtienen aproximadamente 250 g de polvo de DE 13,5.

### 2. Sustrato de dextrina

10 2 g de dextrina de amilasa bacteriana se ponen en suspensión en 80 ml de agua desionizada. La suspensión se hace hervir y se enfría. Se añaden 10 ml de solución tampoadora de acetato de sodio N, y se ajusta el pH a 4,3 por adición de ácido acético, si se desea. La mezcla se completa hasta 100 ml con agua desionizada.

### 3. Reactivo GOD

15 400 mg de glucosa oxidasa (Sigma, cruda)

10 mg de peroxidasa (Sigma, cruda)

1 ml de disolución de o-dianisidina

2 ml de disolución de Tritón X-100

Disolución tamponadora triple, hasta 200 ml.

20 La disolución se filtra antes de su empleo, y se almacena en un refrigerador.

### 4. O-Dianisidina (sigma, cristalina)

Se disuelven 0,5 g en 50 ml de etanol de 96 %

Se envasa en un matraz de color topacio, en la oscuridad, a temperatura ambiente.

### 5. Disolución tamponadora triple

25 0,5 M (pH 7,0). 61,0 de tris (sigma) se disuelven en 85 ml de ácido clorhídrico 5N. Se añade agua desionizada

328684



hasta llegar a 1 litro. El pH se ajusta a 7,0 y se añade 1 ml de cloroformo. Se guarda a temperatura ambiente.

6. Disolución normalizada de glucosa.

5 A 50 mg de glucosa anhidra (M & B, grado reactivo) se añade agua desionizada hasta completar 1 litro.

7. Disolución de Tritón X-100

10 ml de Tritón X-100 + 40 ml de etanol de 96%

10 La disolución de amiloglucosidasa que puede prepararse por medio del presente procedimiento ha sido analizada para determinar el contenido de transglucosidasa añadiendo 1 ml de disolución de enzima (que contiene 10 NA) a 1 ml de disolución de maltosa pura al 6 por ciento tamponadora de acetato 0,1 M (pH 4,6). La mezcla se dejó durante 1 hora a 37°C y después se hizo hervir durante 10 minutos.

15 6 partes, de 5 microlitros cada una, se colocaron sobre un papel cromatográfico, que se dejó revelando hasta el siguiente día con butanol: piridina: agua en las proporciones de 6:4:3.

20 El papel se secó y se hicieron visibles las manchas de azúcar sumergiendo el papel en anilina:difenilamina: ácido fosfórico:etanol, en las proporciones de 0,16:0,16:0,85:100, y se secó a 100°C.

25 La presencia de transglucosidasa en la preparación da como resultado la formación de isomaltosa u oligosacáridos superiores, que en el cromatograma aparecen entre el punto de partida y la mancha de maltosa. Cuando no aparecen manchas en este lugar se deduce que la preparación está desprovista de transglucosidasa.

328684



Esta solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 7 de Julio de 1965, con el número 28.903 y el 15 de junio de 1966 completa, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

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 siguientes:

10

1.- Procedimiento para la producción de amiloglucosidasa, en el cual una cepa de *Aspergillus niger* que no muestra producción detectable de transglucosidasa como se define en la Memoria, es sometida a desarrollo sumergida en un medio nutritivo.

15

2.- Procedimiento como se reivindica en el punto 1, en el cual es empleada una cepa incluida dentro de las especies *Aspergillus niger* variedad Tieghem.

20

3.- Un procedimiento como se reivindica en los puntos 1 y 2, en el cual es empleada la cepa de *Aspergillus niger* variedad Tieghem CBS. Nº 262.65 o una mutación natural o artificial o una variante de ella.

4.- Un procedimiento como se reivindica en los puntos 1 y 2, en el cual es empleada la cepa de *Aspergillus*

328684



niger variedad Tieghem CBS. Nº 263.65 o una mutación natural o artificial o una variante de ella.

5.- Un procedimiento como se reivindica en los puntos 1 y 2, en el cual es empleada la cepa de *Aspergillus niger* variedad Tieghem CBS. Nº 103.66 o una mutación artificial o natural o una variante de ella.

6.- Procedimiento para la producción de amiloglucosidasa.

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

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

4 AGO 1969

Madrid,

P.A.

Alberto de Elizaburu  
Per. Fot. 1969