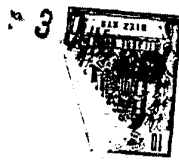


Int. Cl: C12N 9/134 // C12R1: 685



338445

Memoria descriptiva

338445

para solicitar PATENTE DE INVENCION por veinteaños

a nombre de N.V. ORGANON

entidad / de nacionalidad holandesa

con domicilio en establecida en Kloosterstraat 6, Oss,
Holanda,

por:

" PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE
PREPARACIONES DE AMILOGLUCOSIDASA "

(Clase Internacional C12d)

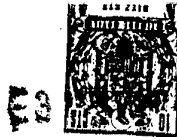


La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar preparaciones de amiloglucosidasa, también llamada en lo sucesivo enzima, para mayor brevedad.

5 Es corrientemente conocido que esta enzima de origen microbiológico (también conocida por los nombres de glucamilasa, gamma-amilasa y, erróneamente, maltasa) es capaz de degradar al almidón, o almidón prehidrolizado, formando glucosa. Esta degradación empieza por el extremo terminal no reductor de la molécula.

10 Las preparaciones de esta enzima son recuperadas generalmente del líquido de cultivo y/o del material celular de microorganismos, especialmente hongos. Son fuentes excelentes los géneros tales como Rhizopus, Endomyces y Aspergillus. Especialmente, las especies de Aspergillus, tales como Aspergillus niger, son organismos muy usados en la industria, debido a que dan la enzima con gran rendimiento. Sin embargo, el valor de esta atractiva fuente queda reducido por el hecho de que la producción de la enzima deseada está acompañada casi siempre por la formación de transglucosidasa no deseada. La acción de la transglucosidasa provoca la formación de enlaces glucosídicos (1-6) a partir de los enlaces glucosídicos (1-4). Los iso-azúcares resultantes, tal como isomaltosa, panosa e isomaltotriosa, no pueden ser degradados ya a glucosa por la amiloglucosidasa, o solamente con gran dificultad (véase, por ejemplo, J. Biol. Chem., 237, 1002, 1962). Así, el rendimiento de glucosa es reducido por formación de iso-azúcares, al tiempo que, además, la cristalización de glucosa de los hidrolizados de almidón con-

338445



centrados es estorbada por la presencia de iso-azúcares. Finalmente, los iso-azúcares reducen mucho el carácter co mestible de las aguas madres de cristalizados de glucosa, por su sabor amargo. Por tanto, está claro que la presen
5 cia de transglucosidasa en preparaciones de amiloglucosidasa es muy indeseable. Esta es, sin duda, la razón más importante de que también se usen especies de Rhizopus pa ra la producción de la enzima, ya que en ellas no se for- ma transglucosidasa. Sin embargo, una desventaja de la
10 producción con especies de Rhizopus es que los rendimien- tos obtenidos son muy bajos, en comparación con los de las especies de Aspergillus. Además, el cultivo sumergi- do de las especies de Rhizopus es muy difícil, debido es- pecialmente a la fragilidad del micelio.

15 Se han hecho diversos esfuerzos para per- feccionar las preparaciones de la enzima, eliminando la transglucosidasa. Así, la patente británica n^o 849.509 describe un método en el que se hace uso de silicatos mag- nésicos sintéticos para la adsorción selectiva de la trans
20 glucosidasa. Una desventaja de tal método es que se re- produce muy mal.

Según la patente EE.UU. n^o 3.108.928, la transglucosidasa puede ser desactivada selectivamente tra-
25 tando la solución de enzima durante 0,5 a 24 horas a un pH de 9 a 11. Sin embargo, éste método tiene diversas des- ventajas, ya que los líquidos de fermentación contienen casi siempre algo de azúcares y proteínas no convertidos, o productos de degradación de los mismos, capaces de formar
30 productos de condensación pardos, por reacción de Maillard, a pH de 9 a 11, lo que constituye un estorbo en la produc-



ción de dextrosa. Además, para esta purificación se necesitan cantidades bastante grandes de álcali, debido a que al final de la fermentación el pH se ha hecho generalmente bajo, es decir, de aproximadamente 2,5 a 3,5. Finalmente, se forma en el producto final una cantidad considerable de sal, que ha de ser eliminada durante la preparación de dextrosa. Es sabido que, en general, las enzimas son muy inestables en medios más bien fuertemente ácidos, por ejemplo por debajo de un pH igual a 2. Una excepción conocida es la pepsina. Sobre la transglucosidasa, se afirma en Chem. Abstracts, 63, 16678a (1965) que es también bastante estable en este pH.

Sorprendentemente, se ha hallado ahora un método para purificar las preparaciones de amiloglucosidasa, caracterizado porque se incuba una solución acuosa de la enzima impura, a pH menor que 2,5.

De esta forma se puede desactivar la transglucosidasa sin pérdida apreciable de actividad de la amiloglucosidasa. Este método es sencillo y barato, debido a que solo requiere la adición del ácido suficiente para obtener el pH requerido; cualquier otra adición no es esencial. La cantidad de sal que se ha de esperar es apreciablemente menor que en la destrucción alcalina de la transglucosidasa, al tiempo que tiene la gran ventaja de que no se forman productos coloreados de condensación. Sorprendentemente, se halló que la amiloglucosidasa es estable a temperatura ambiente, a un pH de aproximadamente 2, durante más de 24 horas. El bajo pH deseado se puede ajustar mediante ácidos fuertes. Desde luego, es condición que el ácido no tenga efecto perjudicial sobre la enzima. Por tanto, son indeseables los ácidos de propie-

338445



dades tensoactivas. Los ácidos usuales son, por ejemplo, el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido acético y ácido fórmico.

5 Las preparaciones de amiloglucosidasa manufacturadas de esta forma presentan propiedades muy favorables en la manufactura de dextrosa a partir de almidón, después de elevar el pH, si es requerido, hasta un valor en el que la enzima muestra su máxima estabilidad. En todas las pre-
10 paraciones tratadas se observó un perfeccionamiento del valor D.U. máximo que se podía obtener. En todos los casos se pudieron obtener valores D.U. de 98 a 98,5%.

El método de destrucción selectiva de la transglucosidasa se puede aplicar tanto a líquidos de cul-
15 tivo, estén o no en presencia del microorganismo, como a concentrados de la preparación de enzima.

El tratamiento consiste en que se añade un ácido al líquido de cultivo, con agitación, esté o no en presencia del organismo productor de la enzima, o a un con-
20 centrado del líquido de cultivo, hasta que se haya alcanzado el bajo pH deseado. El cultivo de la concentración de enzima se mantiene a este pH durante aproximadamente de 15 min a 24 horas, según el valor del pH, preferiblemente a temperatura menor de 40°C. Hay cierta correlación
25 entre el pH aplicado, el periodo de incubación y la temperatura de incubación. La transglucosidasa presente en la preparación es desactivada más rápidamente a menor pH y a mayor temperatura. Desde el punto de vista técnico, un
30 pH aproximadamente igual a 1,9 ha resultado ser el más provechoso. En principio, se puede elegir una temperatura



incluso menor de 0,2C, si se han tomado como material de partida preparaciones de amiloglucosidasa muy concentradas.

Además, se ha hallado que con mayor concentración de sal en la preparación, como sucede en los concentrados de enzima, por ejemplo, la desactivación de la transglucosidasa y también de la amiloglucosidasa transcurre más rápidamente, de manera que para evitar pérdidas de actividad de la amiloglucosidasa, se deben aplicar condiciones más suaves, por ejemplo un periodo de incubación más corto, mayor pH o menor temperatura. En el caso de una concentración mayor que 0,5 molar, de una o más de las sales tales como NH_4Cl , NaCl , CaCl_2 y MgSO_4 , la incubación se efectúa preferiblemente a temperatura ambiente, durante 6 horas, a pH igual a 2,4.

Si se elige una combinación adecuada de pH, período de incubación y temperatura, se puede destruir mas del 90% de la actividad de la transglucosidasa originalmente presente, mientras que la pérdida de actividad de la amiloglucosidasa es muy baja, es decir, del 5% como máximo. Los mejores rendimientos se obtienen efectuando la incubación durante aproximadamente 24 horas, a un pH de aproximadamente 1,9 y a temperatura ambiente, si se usan líquidos de cultivo como material de partida.

Se ha de tener en cuenta que parte de la pérdida de actividad de la amiloglucosidasa ha de ser atribuida a desactivación de la transglucosidasa, que también es capaz de degradar al almidón, como se describe en Arch. Bioch. Biophys., 93, 43 (1961), y por tanto contribuye también a la actividad de la amiloglucosidasa, según se deter



mina más adelante, por ejemplo.

Después del tratamiento, la preparación de enzima se puede seguir tratando de forma usual, tras ajustar el pH a un valor para el que la estabilidad de la enzima sea máxima, en general a un pH de 3 a 6, y preferiblemente de 4,0 a 4,5. Las preparaciones de enzima obtenidas de esta forma dan rendimientos muy altos en la conversación de almidón a glucosa, por métodos usuales, y ello a un valor D.U. de aproximadamente 98 a 98,5%.

La incubación según la invención, y a un pH de aproximadamente 2,4, también puede tener lugar ya durante la última etapa de la fermentación, en la que se forma la amiloglucosidasa, por ejemplo durante las últimas 3 horas, bajo condiciones adaptadas lo más posible a aquellas de la fermentación, para obtener gran ventaja técnica.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA AMILO-
GLUCOSIDASA

Los métodos usuales para la determinación de la actividad de la amiloglucosidasa se basan en la determinación de la cantidad de glucosa desprendida durante la acción de la amiloglucosidasa sobre almidón soluble. En el método descrito a continuación se hace uso del método según Somogyi y Nelson, para la determinación de glucosa que se está desprendiendo, publicado en J. Biol. Chem., 195 19 (1952).

Según las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica, la unidad de actividad de la amiloglucosidasa se define como la cantidad de enzima que forma 1 micromol de glucosa por minuto, a partir de almidón, ba-



jo las condiciones de la determinación, en este caso a pH
igual a 4,5 y a 40°C.

Para la determinación se mezclan 0,8 ml de
tampón de acetato-Na 0,05 M, de pH igual a 4,5, con 1,0
5 ml de una solución que contiene 0,1% de almidón soluble.
La temperatura de esta mezcla se ajusta en un termostato
a $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Luego se añaden 0,2 ml de una solución,
de enzima que contiene de 0,025 a 0,25 u/ml. Después de
exactamente 15 min se interrumpe la incubación, añadiendo
10 2,0 ml de reactivo de Somogyi. Luego se calienta la mez-
cla de reacción en un baño de agua hirviendo, durante exac-
tamente 10 min. Después de enfriar se añaden 2,0 ml de
reactivo de Nelson, y después de mezclar se mide la extin-
ción de la solución resultante. La determinación de con-
15 trol se efectúa añadiendo primero el reactivo de Gomogyi
y luego 0,2 ml de solución de enzima.

El valor hallado es comparado con el de una
solución normal de glucosa que se determina de la misma
forma. La actividad de la enzima puede ser calculada me-
20 diante la fórmula siguiente:

$$\text{Actividad} = \frac{n \cdot E_e}{540 E_g}$$

25 donde E_g = extinción de la glucosa normal menos la deter-
minación de control, a 520 m μ ; E_e = extinción de la deter-
minación de enzima menos la determinación de control, a
520 m μ ; n = microgramos de glucosa por 0,2 ml de solución
normal de glucosa.

338445



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANS-

GLUCOSIDASA

La determinación se basa en la formación de isomaltosa y panosa a partir de maltosa, bajo la influencia de transglucosidasa. La concentración de maltosa es del 5%, y ha sido elegida de forma que haga que no tenga importancia la nueva síntesis de la isomaltosa a partir de la glucosa formada bajo la influencia de la amiloglucosidasa.

Se añaden a 10 ml de una solución al 5% de maltosa en tampón de acetato-Na 0,05 M, de pH igual a 4,5, a 60°C, aproximadamente 12,5 u de una solución de amiloglucosidasa que contiene transglucosidasa. La mezcla de reacción es incubada durante 2,5 horas a 60°C. Después de añadir 2 ml de ácido tricloroacético al 30%, para detener la reacción, se separan 10 microlitros de la mezcla de reacción, en un cromatograma sobre papel, mediante la mezcla n-butanol:piridina:agua, 6:4:3, como líquido móvil.

Después de secar el cromatograma revelado, se hacen visibles las manchas de azúcar con un reactivo sensible. Es muy adecuada una solución de nitrato de plata acetónico, consistente en 1 ml de nitrato de plata saturado en 200 ml de acetona, completada con el agua destilada suficiente para disolver todo el precipitado.

El cromatograma sumergido en el reactivo es secado, tras lo cual es sumergido en álcali metanólico 0,5 N, y luego es mantenido sobre el vapor de agua hirviendo, durante 1 min. El exceso de reactivo es eliminado por lavado con una solución de tiosulfato sódico al 10%, durante 20 min. Las manchas formadas son fijadas en ácido acé-

338445



tico al 1% durante 10 min. Finalmente, el cromatograma es aclarado en agua durante 1 hora. Ahora se puede determinar la cantidad de actividad de la transglucosidasa, midiendo la mancha de panosa sobre el cromatograma, densi-
5 tométricamente, y comparándola con una normalizada.

DETERMINACION DEL VALOR D. U.

Por valor D.U. se quiere decir la cantidad de azúcares reductores formados, calculada como glucosa, dividida por la cantidad de glucosa que se podría obtener
10 teóricamente por hidrólisis de almidón, multiplicada por 100.

El valor D.U. se determinó como sigue:

A un hidrolizado de almidón de aproximadamente 30%, preparado por métodos usuales hidrolizando al-
15 midón con ácido clorhídrico diluído o con alfa-amilasa, se añadieron aproximadamente de 3 a 10 u de solución de amilo-
glucosidasa por gramo de almidón. Después de ajustar el pH a 4,0, se siguió hidrolizando la solución de almidón
durante de 50 a 65 horas, a 60°C. Al final de la hidrólisis se midió el contenido de glucosa, determinando el con-
20 tenido de azúcares reductores según Somogyi y Nelson, descrito en J. Biol. Chem., 195, 19 (1952), a partir del cual se puede calcular el valor D.U.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

25 En los ejemplos siguientes, que se han de considerar como ilustrativos, y no como limitativos, se pueden hallar más detalles sobre el procedimiento.

E J E M P L O 1

A) A 400 ml de filtrado de un cultivo de
30 *Aspergillus niger*, que contenían 46,5 u/ml, se añadieron

338445



a temperatura ambiente, con agitación, 18 ml de ácido clor
 hídrico 1,5 N, hasta que el pH llegó a 1,88. En un perio
 do de 24 horas se tomó un cierto número de muestras, cuya
 actividad de amiloglucosidasa y de transglucosidasa fueron
 5 determinadas. En la tabla siguiente se muestra que al ca
 bo de 24 horas se había destruído el 90% de la actividad
 de la transglucosidasa originalmente presente.

	Periodo de tiempo horas	Actividad de la amiloglucosidasa, en %	Actividad de la trans glucosidasa, en %
10	0	100	100
	1,50	100	98
	3	98	78
	4,50	96	57
	6	95	41
15	16	95	20
	24	95	10

B) El filtrado de cultivo de pH igual a
 1,88, obtenido según A, se ajustó a un pH igual a 4,5,
 20 con amoniaco 2N. Se pre-hidrolizaron 150 g de almidón de
 patata, con alfa-amilasa, en 250 g de agua, a 80°C, hasta
 un valor D.U. de aproximadamente 10. Después de tratar
 en autoclave a 155°C, para desactivar la alfa-amilasa, se
 añadieron 50 ml de tampón de acetato, Na de pH igual a 4,0.
 25 Luego se añadieron 12 ml de la preparación de enzima no
 tratada, que también había sido ajustada a un pH igual a
 4,5 con amoniaco 2 N. Se añadieron 15,6 ml de la prepara
 ción de enzima, tratada según A, a una cantidad igual de
 almidón pre-hidrolizado. Las dos mezclas contenían apro
 30 ximadamente 525 u cada una. Estas mezclas fueron manteni



das a 60°C durante 64 horas, tras lo cual se determinó el valor D.U.

	<u>ANTES DEL TRATAMIENTO</u>	<u>DESPUES DEL TRATAMIENTO</u>
	<u>ACIDO</u>	<u>ACIDO</u>
5	Valor D,U. 95,2%	98,1%

En virtud del tratamiento, la buena actividad de la preparación original de enzima fué perfeccionada en aproximadamente 3%.

E J E M P L O 2

10 A) A 1650 litros de un cultivo de *Aspergillus niger* completamente crecido, en el que estaba aún presente el micelio, y que contenía 60,4 u/ml, se añadieron con agitación, a 21°C, 65 litros de ácido clorhídrico 1,5 N, hasta que el pH llegó a 1,91. El pH se mantuvo estacionario durante 24 horas a 21°C. Al cabo de 24 horas, 15 el cultivo se ajustó a un pH igual a 4,2, añadiendo 20 litros de amoníaco 6N. La pérdida de actividad de amiloglucosidasa durante este tratamiento ascendió al 4%, mientras que fué destruído el 92% de la actividad de la transglucosidasa. 20

B) El valor D.U. que se podía alcanzar con la preparación de enzima, antes y después del tratamiento ácido, se determinó de la misma forma que en el ejemplo 1 B. En este caso, 9,5 ml de la preparación de enzima tratada con ácido, y 8,8 ml de la preparación no tratada, fueron añadidos, cada uno, a 150 g de almidón pre-hidrolizado, que en ambos casos tiene aproximadamente 325 u. Al cabo de 64 horas se determinó el valor D.U.

	<u>ANTES DEL TRATAMIENTO</u>	<u>DESPUES DEL TRATAMIENTO</u>
	<u>ACIDO</u>	<u>ACIDO</u>
30	Valor D.U. 94,9%	98,5%

338445



En este caso, el perfeccionamiento ascendió a más del 3,5%.

E J E M P L O 3

5 A) Se añadieron a 200 ml de un concentrado de amiloglucosidasa (528 u/ml), a 25°C, con agitación, 44 ml de ácido corhídrico 1,5 N. El pH, después de la adición, fué 2,40. El concentrado acidificado fué mantenido a un pH igual a 2,40 durante 6 horas, a 25°C. Después se añadieron 33 ml de amoniaco 2N, con lo que el pH 10 se convirtió en 4,2. Actividad de la amiloglucosidasa después del tratamiento ácido: 365 u/ml. Por tanto, hubo una pérdida de actividad, una vez hecha la corrección debida al cambio de volumen, igual al 4%. La pérdida de actividad de la transglucosidasa fué determinada densitométricamente, siendo igual a 89%.

15 B) De la misma forma descrita en el ejemplo 1 B, se determinó el máximo valor D.U. que se podía alcanzar, añadiendo 1,0 ml de la preparación de enzima no tratada, y 1,4 ml de la tratada, a soluciones de almidón pre-hidrolizado, compuestas por 150 g de almidón, 250 g 20 de agua y 50 ml de tampón de acetato-Na, de pH igual a 4,0. El resultado favorable del tratamiento se pone en evidencia por la tabla siguiente:

	<u>ANTES DEL TRATAMIENTO ACIDO</u>	<u>DESPUES DEL TRATAMIENTO ACIDO</u>
25 Valor D.U. al cabo de 64 horas	94,6%	97,9%

E J E M P L O 4

30 Se mantuvieron 200 ml de un cultivo de Aspergillus flavus (32 u/ml) a pH igual a 1,90, durante 24

338445



horas, a 19°C, después de añadir 12 ml de ácido sulfúrico 1 N. La pérdida de actividad de la amiloglucosidasa ascendió al 95%.

De la misma forma descrita en el ejemplo 1 B, se determinó el máximo valor D.U. que se podía alcanzar, con 25 y 27,5 ml de las preparaciones de enzima, antes y después de la incubación, por 150 g de almidón.

	<u>ANTES DEL TRATAMIENTO ACIDO</u>	<u>DESPUES DEL TRATAMIENTO ACIDO</u>
10 Valor D. U.	89,8%	97,9%

La ganancia del valor D.U. es mayor que 8%.

E J E M P L O 5

Se mantuvieron a un pH igual a 1,65 200 ml de filtrado de cultivo de *Aspergillus niger* (78 u/ml), durante 23 min, a 19°C, tras añadir 12 ml de ácido clorhídrico 1,5 N. Luego se ajustó la solución a un pH igual a 4,2, con 18 ml de amoniaco 2 N.

Las tablas siguientes muestran el favorable efecto del tratamiento según la invención sobre la actividad de la preparación de enzima, y el perfeccionamiento obtenido con él en la hidrólisis de almidón o glucosa.

	<u>ACTIVIDAD DE LA AMILOGLUCOSIDASA</u>		<u>PERDIDA DE ACTIVIDAD</u>	
	<u>Antes del tratamiento ácido</u>	<u>Despues del tratamiento ácido</u>	<u>Amiloglucosidasa</u>	<u>Transglucosidasa</u>
25	78 u/ml	69 u/ml	5%	91%

	<u>ANTES DEL TRATAMIENTO ACIDO</u>	<u>DESPUES DEL TRATAMIENTO ACIDO</u>
Valor D.U.	94,8%	98,4%

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Holanda el 26 de Marzo de 1966, bajo el nº 66.04012



se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

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

10 1.- Procedimiento para la purificación de preparaciones de amiloglucosidasa, caracterizado porque se incuba una solución acuosa de la enzima impura, a pH menor de 2,5.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la incubación se efectúa a un pH aproximadamente igual a 1,9.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se usa como material de partida el líquido de cultivo de un microorganismo de esta enzima.

20 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se incuba un líquido de cultivo a temperatura ambiente, durante aproximadamente 24 horas, a un pH aproximadamente igual a 1,9.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se incuba un concentrado de enzi-



ma que contiene una o más sales, tales como cloruro amónico, cloruro sódico, cloruro cálcico y sulfato de magnesio, en concentración molar aproximadamente igual a 0,5, a temperatura ambiente durante 6 horas, a un pH aproximadamente igual a 2,4.

6.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE PREPARACIONES DE AMILOGLUCOSIDASA" (Clase Internacional C12d).

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

Esta Memoria consta de dieciseis hojas escritas por una sola de sus caras

Madrid,

P. A.

Alberto de Elizabeth
Por Poder

338445