

348590

P.- 36.864

Nº 75944
Case D-1946-Heady etal U.S.
Serial Nº 604.559

Memoria descriptiva

21 FEB 1969



para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de CORN PRODUCTS COMPANY

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 717 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América

por: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR JARABES QUE CONTIENEN MUCHA MALTOSA, UTILES EN CONFITERIA, PANADERIA Y CERVECERIA", (Clase Internacional C141)

15-1-69



La presente invención se refiere a un procedi-
miento perfeccionado para convertir un almidón parcialmen-
te hidrolizado, para obtener productos de conversión con
gran contenido de maltosa. Más en particular, la presente
5 invención se refiere a un procedimiento para preparar pro-
ductos de conversión de gran contenido de maltosa, a par-
tir de un almidón parcialmente hidrolizado, utilizando la
acción hidrolítica combinada de enzimas maltógenas y una
enzima des-ramificadora del almidón.

10 La maltosa es un disacárido de sabor dulce,
mientras que la dextrosa es un monosacárido dulce. La mal-
tosa, como la dextrosa, es un azúcar reductor. Sus jarabes,
como los jarabes de dextrosa, contienen inevitablemente
otros sacáridos. Los jarabes con mucha maltosa son valio-
15 sos para muchas aplicaciones, debido a que presentan menor
tendencia a cristalizar, en comparación con los jarabes de
maíz con mucha dextrosa, y tienden a no ser higroscópicos.

Los jarabes que tienen gran contenido de malto-
sa han sido producidos industrialmente con anterioridad
20 por sacarificación de almidón o hidrolizados de almidón,
con enzimas de malta. La acción de conversión de las enzi-
mas de malta tiene como resultado la producción de un pro-
ducto de conversión en el que la maltosa es el más abundan-
te de los sacáridos presentes. Un método típico de la téc-
25 nica anterior para hacer un jarabe con mucha maltosa impli-
ca la solubilización de almidón, seguida por tratamiento
con enzimas de malta, para sacarificar al almidón solubi-
lizado, de manera que se obtenga un hidrolizado de almidón
que tenga gran contenido de maltosa. Las enzimas adecuadas
30 para este procedimiento de sacarificación han estado limi-
13.1.68.



tadas primordialmente a las enzimas de malta. La sacarifi-
cación o conversión del hidrolizado de almidón se ha efec-
tuado usualmente con enzimas de malta hasta un E.D. de 35
a 55, según el grado de conversión deseado. E. D. es la
5 abreviatura de equivalente de dextrosa, y representa el
total de azúcares reductores presentes, expresados como
dextrosa, en tanto por ciento calculado sobre base seca.

Hasta ahora se consideraba que el límite supe-
rior para la sacarificación económica de malta era aproxi-
10 madamente de 50 a 55 E.D. Tal líquido de conversión con-
tendrá usualmente de 60 a 65% de maltosa. La sacarifica-
ción hasta este grado depende de la operación de solubili-
zación de almidón empleada. Si se desean jarabes con mu-
cha maltosa, más de 55 E.D., se ha conseguido más sacari-
15 ficación con otras enzimas de sacarificación, tal como
amilasa fúngica. Tales enzimas de sacarificación forman
una cantidad considerable de dextrosa, a partir de los sa-
cáridos presentes. Tal segunda operación de sacarifica-
ción tiene usualmente como resultado una ligera disminu-
20 ción de la cantidad total de maltosa presente, pero de to-
das formas produce jarabes de contenido de maltosa relati-
vamente grande, que pueden ser más dulces y que contienen
usualmente una cantidad de fermentables mayor que el jara-
be usual de conversión de malta.

25 Los jarabes con mucha maltosa se han hecho cada vez
más importantes en aplicaciones comerciales. Las composi-
ciones de jarabe que tienen gran contenido de maltosa pro-
porcionan propiedades deseables, no higroscópicas, a los
dulces de azúcar dura. También son útiles para controlar
30 la formación de cristales en formulaciones de postre con-
13.1.68.



5 gelado. Análogamente, el gran contenido de fermentables
en los jarabes con mucha maltosa tiene valor para las in-
dustrias de panadería y cervecería. Aunque las enzimas de
malta han sido conocidas y usadas solas durante un largo
período de tiempo, y se espera que conserven su importan-
cia en la industria, es deseable hallar un procedimiento
sustitutivo para que sea usado en vez del procedimiento de
la enzima de malta para hacer productos de conversión de
almidón que tiene mucha maltosa, que pueda producir jara-
bes con mucha maltosa que tengan propiedades iguales o me-
jores que las producidas por solo el procedimiento de la
encima de malta.

15 Por tanto, una ventaja de la presente inven-
ción es que proporciona un procedimiento nuevo para produ-
cir productos de conversión de almidón que tienen mucha
maltosa, en vez de los procedimientos de la técnica ante-
rior, en los que solo se usaban enzimas de malta.

20 Otra ventaja de la presente invención es que
proporciona un procedimiento nuevo para producir jarabes
con mucha maltosa, que tienen características perfecciona-
das de no cristalización.

25 Otra ventaja de la invención es que proporcio-
na un procedimiento práctico para producir jarabes con mu-
cha maltosa, basado en el uso de enzimas maltógenas en
combinación con una preparación de enzima pululanasa.

30 Aún otra ventaja de la invención es que pro-
porciona un nuevo procedimiento para producir de forma
práctica jarabes con mucha maltosa, el cual es fácilmente
susceptible a perfeccionamientos científicos que permiten
el desarrollo de una economía de funcionamiento.

13.1.68.



Otra ventaja de la presente invención es que proporciona un nuevo procedimiento para producir jarabes con mucha maltosa, que tienen sustancialmente características de no cristalización y características de no higroscop
5 icidad.

Otra ventaja de la invención es la producción de jarabes con mucha maltosa, de contenido de maltosa y fermentables mayor que los producidos hasta ahora.

Aun otra ventaja de la presente invención es que proporciona un procedimiento práctico para producir
10 productos de conversión de almidón que tienen mucha malto
sa, que son útiles para producir productos alimenticios, tales como, por ejemplo, postres congelados que no presen
tan formación de cristales bajo condiciones de baja tempe
15 ratura.

Otras ventajas de la presente invención serán evidentes a continuación, por la descripción siguiente y por lo indicado en las reivindicaciones adjuntas. Todas las partes y tantos por ciento mencionados a continuación
20 son en peso, en base seca, a no ser que se indique expresamente otra cosa.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un producto de conversión de almidón que contiene mucha maltosa, que comprende someter un almi
25 dón parcialmente hidrolizado, que tiene un E.D. no mayor de aproximadamente 20, a conversión con una preparación de enzima maltógena y una preparación de enzima pululana-
sa, para obtener un producto de conversión que tiene un E.D. de al menos aproximadamente 45, un contenido de mal-
30 tosa de al menos aproximadamente 50%, y un contenido de

30
13.1.68.



fermentables de levadura de al menos aproximadamente 80%.
Este producto de conversión puede ser concentrado y refi-
nado, si se desea, para producir un jarabe con mucha mal-
tosa, que no cristaliza. Este jarabe se puede usar para
5 producir sólidos de jarabe con mucho contenido de maltosa,
por concentración y secado del jarabe con mucha maltosa
hasta un contenido de humedad menor de aproximadamente
15%.

10 La invención proporciona también el jarabe con
mucha maltosa preparado concentrando el producto de con-
versión de almidón que contiene mucha maltosa.

La invención proporciona además un producto
sólido de conversión de almidón, que tiene gran contenido
de maltosa, en forma de sólidos de jarabe producidos por
15 concentración y secado del producto de conversión de almi-
dón que contiene mucha maltosa, o del jarabe con mucha
maltosa.

Las enzimas maltógenas están muy extendidas
en la naturaleza. Entre las buenas fuentes de estas enzi-
20 mas se incluyen los granos germinados tales como cebada,
sorgo y trigo, por ejemplo, entre otras fuentes se inclu-
yen los microorganismos; por ejemplo, se pueden obtener
enzimas maltógenas por fermentación, en cultivo sumergido,
de las cepas de la bacteria Bacillus polymyxa.

25 La enzima pululanasa, también denominada dex-
trina alfa-1,6-glucosidasa, es elaborada durante la fer-
mentación en cultivo sumergido, por las cepas de la bacte-
ria Aerobacter aerogenes.

30 A continuación se describirá con detalle el
procedimiento de la invención.

13.1.68.



Hidrólisis parcial de almidón

El almidón parcialmente hidrolizado que se usa como material de partida en la presente invención se obtiene por hidrólisis ácida, o hidrólisis enzimática, de cualquier almidón usual. Entre los almidones adecuados se incluyen los almidones de cereales tales como maíz, grano, sorgo y trigo; almidones céreos tales como sorgo céreo y maíz céreo; y almidones de raíz, tal como fécula de patata y almidón de tapioca. También se pueden usar fuentes de almidón crudo, tales como cereales molidos, tubérculos macerados o los almidones parcialmente purificados procedentes de los mismos.

Antes de la hidrólisis, el almidón es solubilizado por gelatinización. La gelatinización se efectúa calentando el almidón hasta una temperatura mayor de aproximadamente 60°C, en presencia de humedad.

La hidrólisis ácida del almidón se efectúa de manera usual, hasta un E.D. no mayor de aproximadamente 20, preferiblemente hasta un E.D. comprendido entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20.

La hidrólisis enzimática del almidón se efectúa usando enzimas licuadoras adecuadas, hasta conseguir un E.D. no mayor de aproximadamente 20, preferiblemente comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20.

El término "almidón parcialmente hidrolizado", según se usa en lo sucesivo, se refiere al almidón solubilizado, tratado con ácido o con enzima, que tiene un E.D. menor de aproximadamente 20.

Preparación de la enzima

30
13.1.68.

Las enzimas maltógenas usadas en la presente



invención son bien conocidas, y su preparación es bien conocida.

La enzima des-ramificadora, pululanasa, usada en el procedimiento de la invención, es producida por miembros de las especies bacterianas Aerobacter aerogenes, cuando son incubados de forma adecuada bajo condiciones de cultivo aerobio. Las características por las que se pueden distinguir los miembros de las especies de Aerobacter aerogenes están descritas por M.W. Yale, R.S. Breed y otros, en "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Manual Bergey de bacteriología determinante), 7ª ed., págs. 341-342, 1957 (Williams and Wilkins Co., Baltimore), aunque está bien reconocido por los expertos en la ciencia que de vez en cuando se pueden aislar cepas mutantes que no son completamente conformes a esta idéntica descripción.

El método para producir la enzima pululanasa está descrito por Hans Bender y Kurt Wallenfels en un artículo titulado "Specific Decomposition by a Bacterial Enzyme" (Descomposición específica por una enzima bacteriana). El artículo apareció en Biochemische Zeitschrift, 334, 79-95 (1961).

La fuente del cultivo de Aerobacter aerogenes ejemplificado en la presente exposición fue la Colección americana de cultivos tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland. La designación del cultivo era Enterobacter aerogenes ATCC 8724. El siguiente es un método para obtener la enzima del cultivo:

Se introduce en matraces Erlenmeyer de 1000 ml, a razón de 200 ml por matraz, un medio que contiene

13.1.68.



0,8% de bacto-peptona Difco, 0,5% de maltosa, 0,3% de nitrato sódico, 0,05% de fosfato monopotásico, 0,05% de cloruro potásico y 0,001% de sulfato ferroso heptahidratado, con un pH ajustado a 7,2. Los frascos son tapados con tapones de algodón, y esterilizados.

5

El inóculo de cultivo se obtiene transfiriendo asépticamente células de un cultivo puro del microorganismo Aerobacter aerogenes ATCC 8724, desde un cultivo inclinado en de agar a un matraz esterilizado que tiene el medio anterior. Luego se pone el matraz en un agitador alternativo, en una habitación a temperatura constante de 29°C. Se agita el matraz durante 6 horas, tras el cual tiempo el cultivo ha crecido abundantemente, y está listo para ser usado para inocular matraces del medio antes definido. Se transfieren asépticamente 10 ml a cada uno de los matraces de producción de enzima. Luego se ponen estos matraces en un agitador alternativo, en una habitación a temperatura constante de 29°C. Son agitados durante un período de tiempo de 66 a 72 horas. Al final de la fermentación, los matraces son retirados del agitador, se reúnen sus contenidos, y las células que tienen son eliminadas del líquido de cultivo, por centrifugación. El líquido que sobrenada es ajustado luego a un pH igual a 6,2, y conservado por adición de tolueno. Luego se somete a determinación de la actividad enzimática una muestra del líquido que sobrenada. La cantidad de enzima pululanasa producida puede variar entre aproximadamente 0,05 y 0,15 unidades por mililitro.

10

15

20

25

30
13.1.68.

Por el método siguiente se puede obtener una preparación seca concentrada de la enzima pululanasa: se



añaden 1500 ml de acetona enfriada (4°C) a 1 litro de líquido de cultivo exento de células, enfriado (4°C), que contiene 10 g de tierra de diatomeas. Tras mezclar completamente, la suspensión es filtrada bajo vacío, recuperándose la enzima insolubilizada. Una vez completada la filtración, la torta de filtración es recuperada, extendida y dejada secar durante la noche, a temperatura ambiente. Una vez seca la torta de filtración, es sometida a determinación de la actividad enzimática de pululanasa. Las preparaciones obtenidas por este método tendrán una actividad de 3 a 10 unidades por gramo, dependiendo de la actividad del líquido de cultivo usado, y de la eficacia de la recuperación.

El nivel de actividad de la enzima pululanasa presente en las preparaciones de pululanasa se puede determinar como sigue: se ajusta a pH igual a 5,5 una muestra de la solución enzimática, y se añade 1,0 ml a una mezcla de digestión compuesta por 2 ml de una solución de pululán al 5% y 7 ml de un tampón de fosfato M/50, pH igual a 5,5. La reacción se efectúa en tubos de ensayo puestos en un baño de agua a 40°C, y se deja que transcurre durante 1 hora. Al final del período de digestión, se interrumpe la reacción por adición de ácido clorhídrico, para reducir el pH hasta 3,0. El contenido de azúcar reductor en la mezcla de digestión es determinado, igual que el del líquido de cultivo y pululán usados, por una modificación del método del ferricianuro potásico alcalino, descrito más adelante, y se expresa como microgramos equivalentes de dextrosa. La actividad de la enzima pululanasa se calcula como sigue:

13.1.68.



$$A = \frac{T - (C + P)}{180 \times 60} \times D$$

5 donde A = actividad de la enzima pululanasa, unidades por
mililitro o gramo de preparación de enzima; T = total de
azúcares reductores en la mezcla de digestión, en micro-
gramos; C = azúcares reductores residuales en el líquido
de cultivo, en microgramos; P = valor reductor del poli-
sacárido pululán usado en la mezcla de digestión, en mi-
10 crogramos; D = factor de dilución de la preparación de en-
zima; 180 = valor reductor de 1 micromol de dextrosa; 60
= tiempo (min) de reacción.

Una unidad de pululanasa se define como la can-
tidad de enzima requerida para producir 180 microgramos
15 de azúcares reductores, calculados como dextrosa, por mi-
nuto, a partir de pululán, bajo las condiciones antes es-
pecificadas. El polisacárido, pululán, que es un polímero
de unidades de maltotriosa unidas entre sí por enlaces
alfa-1,6, se puede obtener de Pullularia pullulans ATCC
20 9348, usando el método de S. Ueda, K. Fujita, K. Komatsu
y Z. Nakashima que apareció en Applied Microbiology, 11,
211-215 (1963). El método modificado de determinación con
ferricianuro potásico, usado para determinar los agentes
reductores en la determinación de preparaciones de enzima,
25 se efectúa como sigue:

Reactivos.- Ferricianuro alcalino: se disuel-
ven 1,170 g de ferricianuro potásico y 19,5 g de carbona-
to sódico anhidro en agua, y se diluye hasta 1 litro; se
almacena en botella de color ámbar. Solución normalizada
30 de dextrosa, 0,1 mg/ml: se pesa 1,000 g de dextrosa pura
13.1.68.



anhidra, y se diluye hasta 100 ml. Usando una pipeta clase A, se transfieren 10,0 ml de la solución a un matraz de 1 litro, y se diluye hasta la marca.

5 Método.- Normalización: se introducen con pipeta unas porciones de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5 ml de solución normalizada de dextrosa, 0,1 mg/ml, en los respectivos tubos de ensayo de 18 cm. Luego se añade agua en las cantidades necesarias para llevar a 2,5 ml el volumen total en los respectivos tubos de ensayo. El control de reactivo contiene 2,5 ml de agua. Luego se añaden a cada tubo 5 ml de la solución de ferricianuro alcalino. Después se calienta la mezcla en un baño de agua hirviendo, durante exactamente 5 min, y se enfría inmediatamente en un baño de agua del grifo, se diluye con agua hasta un volumen de 12,5 ml, y se mezcla. Usando agua como solución de referencia, a adsorbancia igual a 0, se determina la absorbancia del control y de cada uno de los tubos normalizados, a 373 μ , en un espectrofotómetro Beckman DU, usando cubetas de 1 cm.

10
15
20 Análisis.- Se usa una porción de preparación de enzima que produzca de 1 a 10 mg de azúcares reductores por 10 ml de mezcla de digestión. La muestra de la mezcla de digestión sometida a determinación por este método contendrá de 50 a 250 microgramos de azúcar reductor.

25 Cálculo.- Se representan las absorbancias de los tubos normalizados, corregidas teniendo en cuenta el control, frente a los microgramos de dextrosa por 12,5 ml, en un gráfico de coordenadas lineales, para obtener la curva de normalización.



Conversión de almidón parcialmente hidrolizado

En la producción comercial de jarabes con mucha maltosa, es corriente que las conversiones se efectúen a niveles de sustancia seca relativamente altos, usualmente comprendidos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40%, para reducir los requisitos de tamaño de los depósitos y costes de evaporación, y a temperaturas relativamente altas, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 50 a aproximadamente 60°C, para retrasar o impedir que se estropeen los microbios de los líquidos de conversión. Muchas enzimas son inhibidas a altas concentraciones de substrato y altas temperaturas, tales como las mencionadas antes. Sin embargo, sorprendentemente, la pululanasa preparada según lo que antecede es completamente susceptible de ser usada bajo las condiciones requeridas para que tengan éxito y sean económicas las operaciones industriales para producir productos de conversión con mucha maltosa, a partir de almidón.

El procedimiento preferido para el uso combinado de una enzima maltógena y pululanasa comprende trabajar dentro de las condiciones del substrato y de los intervalos de temperatura antes mencionados, aunque se pueden usar las enzimas para convertir mayores o menores concentraciones de substrato, en cualquier punto dentro del intervalo de temperaturas de aproximadamente 30 a 70°C, si se desea. Las conversiones se pueden efectuar dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a 8,0, siendo el intervalo preferido de 5,0 a 6,5. El tiempo requerido para la conversión de almidón parcialmente hidrolizado en un producto de conversión de almidón con mucha maltosa de

30
13.1.68.



5 penderá de la dosis de enzima empleada, y del grado de conversión deseado. Sin embargo, se pueden producir convenientemente productos de conversión de almidón con mucha maltosa, a dosis de enzima razonables, en períodos de conversión de 24 a 48 horas.

10 La conversión del almidón parcialmente hidrolizado se puede efectuar usando simultáneamente enzima maltógena y pululanasa, o se puede aplicar la pululanasa antes o después que la enzima maltógena. Como se mostrará en los siguientes ejemplos, el procedimiento preferido es la aplicación simultánea de la enzima maltógena y la pululanasa.

15 Los productos de conversión de almidón se pueden concentrar y/o refinar para producir jarabes con mucha maltosa. Estos jarabes son sustancialmente no cristalizadores, y presentan propiedades no higroscópicas. Para obtener estos jarabes, los productos de conversión de almidón son concentrados hasta un contenido de sólidos mayor del 50%. Los productos se pueden refinar por métodos usuales, tales como refinación con carbono, tratamiento 20 de intercambio de iones, y similares, para obtener jarabes que son sustancialmente no cristalizadores y que tienen contenidos de maltosa comprendidos entre aproximadamente 50 y aproximadamente 90%, en base seca.

25 En los siguientes ejemplos de funcionamiento, que ilustran a la invención, todos los tantos por ciento son en peso, en base seca, y todas las temperaturas están en grados centígrados.



Ejemplo 1

Producción de productos de conversión con mucha maltosa

5 En este ejemplo se ilustra el uso simultáneo de una enzima maltógena y pululanasa, en la preparación de productos de conversión de almidón con mucha maltosa, a partir de almidón parcialmente hidrolizado con enzimas. En este ejemplo se ilustran también las dosis variadas de pululanasa y diastasa de malta, en combinaciones, para producir los productos de conversión con mucha maltosa y
10 ricos en fermentables.

Una suspensión de almidón de maiz al 30% en peso fue licuada enzimáticamente a 91°C, pH 5,5, usando HT-1000 (preparación de alfa-amilasa bacteriana producida y vendida por Miles Chemical Company), en dosis de 0,05%
15 en base seca. La acción de licuación de la enzima fue interrumpida por calentamiento del almidón licuado a 121°C durante 15 min, cuando el almidón parcialmente hidrolizado llegó a un E.D. de 2 a 5. El almidón parcialmente hidrolizado fue enfriado hasta 55°C, y se ajustó el pH a 5,8. Luego se dosificó el almidón parcialmente hidrolizado con los
20 niveles respectivos de enzimas pululanasa y maltógena que se muestran en la tabla 1. En la tabla 1 se indican también los valores E.D. obtenidos, y las composiciones de carbohidrato son para 24 y 48 horas de conversión.

Tabla 1
Composición de los líquidos de conversión

Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de diastasa de malta, unidades/100 g sustancia seca	E.D.	Dextrosa, % en base seca	Maltosa, % en base seca	Maltotriosa, % en base seca	DP ₄ y superiores, % en base seca	Fermentables, % en base seca
0	25	42,3	24 horas	60,0	11,8	27,6	72,4
0	50	45,5	0,6	61,5	11,9	23,9	76,1
0	100	47,3	3,2	63,5	12,3	21,0	79,0
0	200	49,4	3,6	66,5	12,0	17,9	82,1
50	25	48,6	0,9	70,0	13,7	15,4	84,6
50	50	49,9	2,2	70,4	13,6	13,1	86,9
50	100	51,7	3,5	71,9	14,6	10,0	90,0
50	200	52,5	2,7	73,4	14,2	9,7	90,3
100	25	49,7	1,7	71,5	15,5	11,3	88,7
100	50	51,4	1,4	72,8	16,3	9,5	90,5
100	100	52,2	2,2	72,2	16,6	8,7	91,3
100	200	53,4	4,2	73,4	15,0	7,4	92,6
200	25	50,5	0,5	74,0	15,9	9,6	90,4
200	50	51,5	2,3	72,4	16,4	8,9	91,1
200	100	52,5	1,6	76,0	15,3	7,1	92,9
200	200	53,6	1,6	76,4	16,4	5,6	94,4



13.1.68.

Tabla 1 (continuación)

Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de diastasa de malta ^{xx} , unidades/100 g sustancia seca	E.D. seca	Dextrosa, % en base seca	Maltosa, % en base seca	Maltotriosa, % en base seca	DP ₄ y superiores, % en base seca	Fermentables ^{xxx} , % en base seca
0	25	43,5	1,9	61,6	9,8	26,7	73,3
0	50	47,6	3,3	64,5	11,6	20,6	79,4
0	100	51,1	4,0	67,0	12,5	16,5	83,5
0	200	51,9	3,8	71,1	11,7	15,5	86,5
50	25	51,5	4,1	72,0	14,4	9,5	90,5
50	50	52,8	2,4	75,0	14,8	7,8	92,2
50	100	54,7	3,4	75,0	15,2	6,4	93,6
50	200	56,2	4,5	75,5	14,0	6,0	94,0
100	25	52,9	1,5	75,4	15,9	7,2	92,8
100	50	54,3	1,9	76,5	16,0	5,6	94,4
100	100	54,2	2,8	77,2	14,6	5,4	94,6
100	200	55,7	3,5	77,6	13,8	5,1	94,9
200	25	52,8	1,2	76,0	15,9	6,9	93,1
200	50	52,4	1,5	76,5	16,0	6,0	94,0
200	100	54,3	2,4	77,0	15,3	5,3	94,7
200	200	54,9	3,7	77,6	13,8	4,9	95,1

48 horas

17

^{xx} 40 unidades de diastasa de malta equivalen a 1% de malta de cebada de destilería que tenga un índice Lintner de 200 a 220eL

^{xxx} Dextrosa, maltosa y maltotriosa





La siguiente tabla 2 es una redistribución de una porción de los datos de la tabla precedente, demostrando los reducidos requisitos de cantidad de enzima maltógena necesarios para alcanzar un E.D. dado, cuando se usa enzima pululanasa además de la enzima de malta, en la producción de productos de conversión con mucha maltosa, ricos en fermentables.

Tabla 2

Valores E.D. comparativos de líquidos de conversión

	Dosis de pululanasa (unidades/100 g sustancia seca)	Dosis de diastasa de malta (unidades/100 g sustancia seca)	E. D.	
			24 horas	48 horas
10	0	25	42,3	43,5
	0	50	45,5	47,6
	0	100	47,3	51,1
15	0	200	49,4	51,9
	0	25	42,3	43,5
	50	25	48,6	51,5
	100	25	49,7	52,9
20	200	25	50,5	52,8

La tabla 3 muestra la composición de líquidos hidrolizados representativos, y demuestra que unas dosis reducidas de las enzimas maltógenas producen jarabes con más maltosa, muy fermentables, cuando se usan junto con la enzima pululanasa, en comparación con mayores niveles de enzima maltógena sola. Los resultados muestran también que a un valor E.D. dado se pueden conseguir mayores niveles de maltosa usando combinaciones de enzima pululanasa y maltógena, en comparación con los que se pueden conseguir solo con enzimas maltógenas.

13.1.68.

Tabla 3

Composición de los líquidos hidrolizados

Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de diastasa, de malta, unidades/100 g sustancia seca	E. D. se seca	24 horas		Dextrosa, Maltosa, % en base se seca	Maltotriosa, % en base se seca	DP ₄ , y superiores, % en base se seca	Fermentables, % en base se seca
0	50	45,5	2,7	61,5	11,9	23,9	76,1	
0	100	47,3	3,2	63,5	12,3	21,0	79,0	
0	200	49,4	3,6	66,5	12,0	17,9	82,1	
0	25	42,3	0,6	60,0	11,8	27,6	72,4	
50	25	48,6	0,9	70,0	13,7	15,4	84,6	
100	25	49,7	1,7	71,5	15,5	11,3	88,7	
200	25	50,5	0,5	74,0	15,9	9,6	90,4	
			48 horas					
0	50	47,6	3,3	64,5	11,6	20,6	79,4	
0	100	51,1	4,0	67,0	12,5	16,5	83,5	
0	200	51,9	3,8	71,1	11,7	13,5	86,5	
0	25	43,5	1,9	61,6	9,8	26,7	73,3	
50	25	51,5	4,1	72,0	14,4	9,5	90,5	
100	25	52,9	1,5	75,4	15,9	7,2	92,8	
200	25	52,8	1,2	76,0	15,9	6,9	93,1	





Ejemplo 2

Producción de productos de conversión con mucha maltosa,
a partir de almidón de sorgo céreo, parcialmente hidroliz-
ado mediante enzimas

5 En este ejemplo se ilustra el efecto de re-
fuerzo de la pululanasa cuando se usa con diastasa de mal-
ta, en la conversión de almidones céreos en productos de
conversión con mucha maltosa, muy fermentables.

10 Un almidón de sorgo céreo fue licuado enzimá-
ticamente hasta E.D. igual a 5, como se esquematiza en el
ejemplo 1, y fue enfriado hasta 50°C, ajustado a pH 5,7
y dosificado con enzimas pululanasa y diastasa de malta
simultáneamente, como se muestra en la tabla 4. La tabla
4 muestra también los análisis de los líquidos de conver-
15 sión, al cabo de 46 y 70 horas de conversión.

13.1.68.

Tabla 4 Composición de líquidos de conversión

Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de diastasa de malta, unidades/100 g sustancia seca	E.D. se seca	46 horas			70 horas		
			% en base se seca	Maltosa, % en base se seca	Maltotriosa, % en base se seca	DP4 y superiores, % en base se seca	Fermentables, % en base se seca	
0	20	38,5	2,75	54,5	8,35	35,4	64,6	
100	20	47,6	3,4	73,0	16,9	6,4	93,6	
200	20	48,9	1,3	73,5	16,3	7,6	92,4	
0	80	44,7	4,1	60,5	10,3	25,1	74,9	
100	80	51,4	3,2	73,0	16,7	7,1	92,9	
200	80	51,9	3,1	75,5	19,3	2,1	97,9	
0	20	39,5	1,6	53,5	10,7	34,2	65,8	
100	20	49,6	2,6	74,7	12,5	11,2	88,8	
200	20	51,0	1,4	75,0	18,0	5,6	94,4	
0	80	47,2	4,4	64,0	10,4	21,2	78,8	
100	80	53,4	3,7	74,0	15,0	7,3	92,7	
200	80	53,0	2,4	78,5	16,7	1,4	98,6	





Como se ilustra en el ejemplo 1, el efecto de refuerzo producido por la pululanasa cuando se usa junto con las enzimas maltógenas vuelve a ser evidente.

Ejemplo 3

5 Producción de productos de conversión con mucha maltosa a partir de enzimas maltógenas de almidón de maíz procedentes de fuentes distintas del malta

10 En este ejemplo se ilustra el efecto de refuerzo de la pululanasa en la producción de productos de conversión con mucha maltosa, muy fermentables, por aplicación simultánea de enzimas pululanasa y maltógenas distintas de las derivadas del malta, tal como, por ejemplo, Bacillus polymyxa.

15 Un ejemplo de una enzima maltógena adecuada es la enzima microbiológica producida por la bacteria Bacillus polymyxa. Se puede preparar a partir de B. polymyxa ATCC 8523, y la actividad de la preparación enzimática resultante se puede determinar por el método siguiente.

Preparación de la enzima

20 La preparación de enzima identificada como amilasa de Bacillus polymyxa se prepara haciendo crecer Bacillus polymyxa en un medio adecuado, por técnicas de cultivo sumergido, cultivo estacionario o cultivo superficial, a temperaturas de 20 a 40°C, durante aproximadamente de 24 a 144 horas. Un medio satisfactorio contendrá cantidades adecuadas de fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico, tales como, por ejemplo, líquido de maceración de maíz, extracto de levadura, levadura seca, extracto de carne de vacuno, peptona, harina de semilla de algodón o de soja, y sales amónicas inorgánicas; fuentes de

30
13.1.68.



carbono tales como almidón, almidón modificado, hidrolizados de almidón, y similares; y sales inorgánicas.

5 Un método para producir la enzima se describe como sigue. Unas células de un cultivo en cultivo inclinado de B. polymyxa ATCC 8523 fueron inoculadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía un medio estéril, compuesto por 4,0 g de maiz amarillo molido, 0,4 g de extracto de levadura, 0,5 g de carbonato cálcico, y agua destilada hasta 100 ml. El matraz inoculado fue incubado
10 durante 48 horas a 32°C en un agitador rotatorio. Una porción de 10 ml del cultivo de este matraz fue introducida asépticamente en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía un medio estéril de producción, compuesto por 6,0 g de peptona, 1,0 g de extracto de levadura, 1,0 g de extracto de carne de vacuno, 16 g de fécula de patata, 0,2 g de fosfato dipotásico, y agua destilada hasta 200 ml. Se ajustó el pH a 7,2. Los matraces de producción fueron incubados a 32°C en un agitador rotatorio, mientras la enzima era producida y excretada al medio de cultivo. Al cabo de
20 7 días de fermentación se filtró el contenido de los matraces, y la enzima maltógena, presente en cantidad equivalente a 0,2 unidades/ml, según se define más adelante, fue recuperada en el filtrado. Luego se usó esta enzima, en forma de filtrado, para la conversión de hidrolizados de almidón en productos con mucha maltosa.

25 El nivel de actividad enzimática presente en caldos de fermentación de B. polymyxa, o en concentraciones de enzima, se determinó como sigue. El substrato de enzima consistía en una solución acuosa al 10% de un hidrolizado ácido de almidón de maiz, secado por pulverización,
30
13.1.68.



con E.D. de 15 a 18. Se midieron con pipeta exactamente 50 ml de la solución en un matraz volumétrico de 100 ml. Se añadieron al matraz 5,0 ml de un tampón de fosfato 1,0 molar, pH igual a 6,5. Luego se puso el matraz en un baño de agua a 40°C. Al cabo de 10 min se añadió al matraz una cantidad de enzima que tenía de 0,2 a 0,4 unidades de actividad, según se definen más adelante. Exactamente a los 60 min después de la adición de enzima se interrumpió la adición, ajustando la solución al punto de viraje de la fenolftaleína con hidróxido sódico 1 molar. Luego se enfrió la solución hasta la temperatura ambiente, y se diluyó hasta el volumen. El índice de azúcar reductor, calculado como dextrosa, fue determinado en la muestra diluída y en un control al que no se añadió enzima. La actividad de enzima maltógena fue calculada como sigue:

$$A = \frac{S - B}{E}$$

donde A = actividad de la enzima maltógena, unidades por ml de preparación de enzima; S = azúcares reductores en la muestra convertida mediante enzimas, en gramos por 100 ml; B = azúcares reductores en el control, en gramos por 100 ml; E = cantidad de preparación de enzima usada, ml.

La amilasa de Bacillus polymyxa preparada según lo que antecede fue usada para convertir una dispersión de fécula de maiz en agua, con 30% de sustancia seca, que había sido parcialmente hidrolizada mediante enzimas, según el método del ejemplo 1. Las conversiones se efectuaron a 60°C a un pH igual a 6,2, usando los niveles de enzima que se muestran en la tabla 5.

30
13.1.68.



Igual que con las enzimas maltógenas de origen vegetal, se pueden conseguir composiciones con más maltosa, más ricas en fermentables, con una combinación de pululanasa y una enzima maltógena microbiológica, en comparación con las que se pueden obtener con la enzima maltógena microbiológica sola. Análogamente, a un valor E.D. dado, los niveles de maltosa que se pueden conseguir con una combinación de pululanasa y enzima maltógena son mayores que los que se pueden conseguir con enzimas maltógenas solas, y las cantidades de enzima maltógena requeridas para alcanzar un E.D. dado se reducen sustancialmente cuando se usa la enzima maltógena en combinación con pululanasa.

13.1.68.

Tabla 5

E.D. y composición de líquidos hidrolizados obtenidos usando enzimas maltógenas de *B. polymyxa* y pululanasa

Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de enzima de <i>B. polymyxa</i> , unidades/100 g sustancia seca	Tiempo de hidrólisis, horas	E.D.	Dextro- sa, % base seca	Malto- sa, % base seca	Maltotri- osa, % ba- se seca	DP ₄ y superio- res, % base seca	Fermenta- bles, % base se- ca
0	12	24	43,5	0,0	62,2	10,8	27,0	73
0	12	72	46,2	1,6	63,4	11,7	23,3	76,7
50	12	24	46,6	0,0	67,4	14,0	18,6	81,4
50	12	72	52,2	0,4	74,9	16,2	8,5	91,5
100	12	24	48,4	0,7	69,4	14,8	15,1	84,9
100	12	72	53,0	1,6	76,4	13,7	8,3	91,7
0	25	24	46,0	0,0	64,1	9,3	26,6	73,4
0	25	72	50,0	3,6	69,6	6,9	19,9	80,1
50	25	24	50,7	1,7	70,0	12,9	15,4	84,6
50	25	72	54,1	5,7	71,3	14,4	8,6	91,4
100	25	24	51,5	2,4	72,0	14,7	10,9	89,1
100	25	72	55,3	2,9	76,4	13,5	7,2	92,8
0	50	24	50,9	3,9	66,1	8,6	21,4	78,6
0	50	72	52,2	5,6	69,0	6,3	19,1	80,9
50	50	24	52,8	4,3	70,9	12,1	12,7	87,3
50	50	72	56,1	5,3	75,9	9,1	9,7	90,3
100	50	24	54,5	2,9	74,8	13,6	8,7	91,2
100	50	72	56,7	4,8	79,5	9,3	6,4	93,6



13.1.68.

Tabla 5 (Continuación)

Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de enzima de B. polymyxa, unidades/100 g sustancia seca	Tiempo de hidrólisis, horas	E. D.	Dextro Maltosa, % base seca	Maltotriosa, % base seca	DP4 y superiores, % base seca	Fermentables, % base seca
0	100	24	52,6	6,3	69,1	4,2	79,6
0	100	72	54,7	6,8	73,3	0,8	80,9
50	100	24	55,2	5,8	75,9	8,7	90,4
50	100	72	58,3	9,1	76,7	5,6	91,4
100	100	24	55,7	7,6	75,2	9,3	92,1
100	100	72	58,5	7,2	79,4	4,9	91,5





Ejemplo 4

Una solución al 30% en peso, de un hidroliza-
do ácido de fécula de maiz, E. D. igual a 16, preparado
por medios usuales de hidrólisis ácida, fue convertido a
5 55°C, pH igual a 6,0, durante 72 horas, con la cantidad
de pululanasa y enzimas de malta que se muestra en la ta-
bla siguiente. También se muestran los resultados de la
conversión.

10	Dosis de pulula- nasa, unidades/ 100 g sustancia seca	Dosis de malta, unidades/ 100 g sus- tancia se- ca	Resultados de la conversión	
			E.D.	Contenido de mal- tosa, % base seca
	Nada	Nada	16,1	4,1
	Nada	25	45,7	56,6
15	Nada	50	47,4	55,8
	50	25	49,6	61,5
	50	50	52,0	64,0
	100	25	51,0	67,3
	100	50	52,4	66,6

20

Ejemplo 5

Aplicación simultánea y sucesiva de pululanasa y enzima
maltógena en la producción de productos de conversión con
mucha maltosa

25

Aunque desde el punto de vista de la eficacia,
así como de la conveniencia, lo más deseable es añadir si
multáneamente tanto la enzima pululanasa como la maltóge-
na, para convertir el almidón parcialmente hidrolizado en
composiciones con mucha maltosa, el efecto beneficioso de
la pululanasa se puede obtener incluso cuando se añade es

30
13.1.68.



ta enzima antes de la adición de enzima maltógena. Este se ilustra en este ejemplo.

5 Una suspensión al 30% de almidón de sorgo blanco fue licuada mediante enzimas, siguiendo el método descrito en el ejemplo 2, y convertida a 55°C, a un pH igual a 6,0, usando los niveles de pululanasa y enzima de malta que se muestran a continuación en la tabla 7

13.1.68.

Tabla 7

Efecto de la adición de pululanasa al líquido de conversión en diversos momentos

Momento de adición de pululanasa	Dosis de pululanasa, unidades/100 g sustancia seca	Dosis de malta, unidades/100 g sustancia seca	Conversión, E.D.	Composición del hidrolizado, % base seca				Fermentables, % base seca*
				DP ₁	DP ₂	DP ₃	DP ₄ y superiores	
24 horas antes que el malta	100	25	50,2	5,1	67,2	14,0	13,7	86,3
con el malta	100	25	53,2	2,8	72,1	17,0	8,1	91,9
24 horas después del malta	100	25	41,1	1,6	54,8	14,2	29,4	70,6
sin pululanasa (control)	0	25	35,5	2,0	50,4	9,5	38,1	61,9

* Total de DP₁, DP₂ y DP₃





Como puede verse, la adición de los dos sistemas de enzima simultáneamente produce la hidrólisis más eficaz; sin embargo, se observa el efecto de refuerzo de la pululanasa cuando es añadida antes que, simultáneamente con, o después que las enzimas maltógenas.

Entre las ventajas de la invención que pueden verse por la anterior descripción y ejemplos se incluyen:

1. La producción de productos de conversión que contienen composiciones con más maltosa, más fermentables, obtenidas por aplicación simultánea de pululanasa con una enzima maltógena, en la conversión de un almidón parcialmente hidrolizado.

2. Tiene lugar una hidrólisis más eficaz, con la resultante reducción de la cantidad de almidón no convertido, por uso suplementario de la enzima pululanasa junto con enzima maltógena, para la producción de productos de conversión de almidón, con mucha maltosa, a partir de almidón parcialmente hidrolizado.

3.- Los requisitos de enzima maltógena se reducen sustancialmente cuando es usada simultáneamente junto con pululanasa, para obtener un E.D. dado, en la conversión de almidón parcialmente hidrolizado.

4. Debido a la más eficaz conversión de almidón en composiciones con mucha maltosa, muy fermentables, los líquidos de conversión resultantes tienen menos variaciones, y por tanto sirven mejor como composición de base con la que se mezcla dextrosa para producir jarabes mixtos comestibles.

Aunque la invención ha sido descrita en relación a realizaciones específicas de la misma, se entiende
30
13.1.68.



rá que es susceptible de otras modificaciones²¹ y se pretende cubrir en esta solicitud cualquier variación, uso o adaptación de la invención que siga, en general, a los principios de la invención expuestos, e incluyendo las
5 modificaciones de la presente exposición que caigan dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a que se refiere la invención, y que se puedan aplicar a las características esenciales antes expuestas, y que caigan dentro del ámbito de la invención y de los límites de
10 las reivindicaciones adjuntas.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 27 de Diciembre de 1966, bajo el número 604.559, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.
15

REIVINDICACIONES

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:
20

1.- Procedimiento para preparar jarabes que contienen mucha maltosa, útiles en confitería, panadería y cervecería, caracterizado por someter un almidón parcialmente hidrolizado, que tiene un E.D. no mayor de aproximadamente 20, a conversión con una preparación de -
25 enzima maltógena y una preparación de enzima pulu---



lanasa, para obtener un producto de conversión que tiene un E.D. de al menos aproximadamente 45, y un contenido de maltosa de al menos aproximadamente 50%, y un contenido de fermentables de levadura de al menos aproximadamente 80%.

5

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el almidón parcialmente hidrolizado es un almidón hidrolizado mediante ácido.

10

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el almidón hidrolizado ácido tiene un E.D. comprendido entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20.

15

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el almidón parcialmente hidrolizado es un almidón hidrolizado mediante enzimas.

5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el almidón parcialmente hidrolizado tiene un E.D. de aproximadamente 2 a aproximadamente 20.

20

6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el almidón parcialmente hidrolizado tiene un contenido de sólidos de aproximadamente 15 a aproximadamente 40%.

25

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la conversión con la enzima se efectúa a una temperatura comprendida entre aproximadamente 50 y aproximadamente 60°C.

30
13.1.68.

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el producto de conversión contiene de aproximadamente 50 a aproximadamente 90% de maltosa, en base seca.



9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la enzima pululanasa y maltógena se aplican simultáneamente a la mezcla de reacción de conversión.

5 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la pululanasa se aplica a la mezcla de reacción de conversión antes de aplicar la enzima maltógena.

10 11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la enzima maltógena se aplica a la mezcla de reacción de conversión antes de aplicar la enzima pululanasa.

15 12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la enzima maltógena es amilasa de Bacillus polymyxa.

13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la enzima maltógena es diastasa de malta.

20 14.- Procedimiento según la reivindicación 1, para preparar un jarabe con mucha maltosa, caracterizado por concentrar un producto de conversión con mucha maltosa, preparado según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para obtener un jarabe que tiene un contenido de sólidos mayor del 50%, y donde la maltosa
25 representa al menos aproximadamente 50% en peso de los sólidos presentes en él, en base seca,

30 15.- Procedimiento según la reivindicación 1, para preparar un producto sólido de conversión de almidón, que tiene gran contenido de maltosa, caracterizado por con
30 centrar un producto de conversión con mucha maltosa, pre-
13.1.68.



parado según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o un jarabe con mucha maltosa preparado según el procedimiento de la reivindicación 14, hasta sequedad, para producir un producto sólido.

5 16.- Procedimiento para preparar jarabes que contienen mucha maltosa, útiles en confitería, panadería y cervecería.

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

10 Esta Memoria consta de treinta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 21 FEB. 1969

P.A.

[Handwritten signature]