

405697



P.- 51.746

2122

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int Cl.² C13K, C12K

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

A nombre de AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY

entidad japonesa

establecida en 3-1, Kasumigaseki 1 chome, Chiyoda-ku,
Tokyo, Japón.

por: "UN METODO MEJORADO PARA DESCOMPONER LA RAFINOSA
CONTENIDA EN EL ZUMO DE REMOLACHA O EN MELAZAS
DE REMOLACHA, EN GALACTOSA Y SACAROSA"

(Clase Internacional C12k, C13k)

405697



Este invento se refiere a un método para descomponer rafinosa por utilización de alfa-galactosidasa producida a partir de microorganismos.

La alfa-galactosidasa es ampliamente conocida
5 como una enzima capaz de descomponer rafinosa contenida en melazas de remolacha o jugo de remolacha (denominados en lo que sigue como "melazas de remolacha") en sacarosa y galactosa. Se ha sabido que varias especies de microorganismos toman parte en la producción de dicha
10 enzima. Ejemplos de ellos son: Aerobacter aerogenes y E. coli. Cuando la enzima producida a partir de estos microorganismos es hecha actuar sobre melazas de remolacha, sin embargo, la invertasa que coexiste con la alfa-galactosidasa tiene una actividad tan fuerte que no sólo
15 se descompone la rafinosa sino también la sacarosa presente en las melazas o jugo de remolacha. Por ocurrir esto así, la enzima no ha sido llevada todavía a utilización en la práctica.

Los inventores dedicaron particular interés a
20 este problema y prosiguieron el estudio del mismo. Como consecuencia de ello, han llegado anteriormente a aislar desde la tierra un moho, Mortierella vinacea variedad utilizadora de rafinosa (ATCC 20034), que permite la producción de un preparado de enzima que tiene intensa
25 actividad de alfa-galactosidasa y muy débil actividad de

405697



invertasa. Mediante la utilización del preparado de enzima producido a partir de dicho microorganismo, descompusieron satisfactoriamente la rafinosa presente en melazas de remolacha de manera que se aumentaba el rendimiento de sacarosa.

Sin embargo, cuando el preparado de enzima producido a partir del microorganismo antes mencionado es utilizado para descomponer rafinosa, la proporción de descomposición de rafinosa por alfa-galactosidasa tiene una íntima relación con el grado Brix de las melazas de remolacha que se utilizan. A saber, la proporción de descomposición disminuye proporcionalmente según aumenta el grado Brix. Consiguientemente, para tratar las melazas que tienen un alto grado Brix, la proporción de descomposición debe ser aumentada incrementando la cantidad de esta enzima añadida a las melazas. Generalmente, para todos los procedimientos de producción de azúcar de remolacha exceptuando el proceso de sacarato, se desea que las melazas de remolacha que son tratadas para la descomposición de rafinosa retengan un elevado grado Brix con el fin de facilitar diversos tratamientos, tales como el proceso de concentración de solución de azúcar, subsiguientemente a la descomposición y el proceso de separación de azúcar puro desde la solución concentrada de azúcar. Para mantener

405697



la proporción de descomposición de rafinosa en un nivel fijo, por lo tanto, la operación requiere una gran cantidad de preparado de enzima. Por lo tanto, el costo implicado en la producción de enzima se hace elevado, haciendo irrealizable comercialmente la operación. Además de este problema económico, la adición de una gran cantidad de preparado de enzima está acompañada por la posibilidad de que el componente de micelio se derrame en la solución de azúcar descompuesta subsiguientemente al completamiento de la descomposición e impida la cristalización de sacarosa.

Es verdad que el preparado de enzima producido a partir de dicho microorganismo tiene muy débil actividad de invertasa. No obstante, a pesar de ello, si el preparado de enzima es utilizado en una cantidad tan grande como arriba se menciona, la cantidad de sacarosa descompuesta por la invertasa contenida en el preparado de enzima subirá hasta que ya no se encuentre a un nivel despreciable.

Los objetos del presente invento son suprimir los defectos antes mencionados, producir a partir de un microorganismo un preparado de enzima que tenga una actividad de alfa-galactosidasa extremadamente alta y manifiestamente una débil actividad de invertasa por unidad de peso del preparado de enzima, descomponer

405697



la rafinosa contenida en las melazas de remolacha en ga
lactosa y sacarosa por utilización de dicho preparado
de enzima, y aumentar el rendimiento de sacarosa.

Los inventores continuaron adicionalmente
5 una investigación acerca de microorganismos que tuvie-
sen la capacidad de producir mayor actividad de alfa-ga-
lactosidasa y además evitasen dar lugar a actividad de
invertasa. Como consecuencia de ello, han descubierto
un método para producir un preparado de enzima caracte-
10 rizado por fuerte actividad de alfa-galactosidasa y muy
débil actividad de invertasa, el cual método comprende
cultivar un moho del género Absidia en un medio de cul-
tivo específico bajo una serie establecida de condi-
ciones.

15 Los microorganismos que son utilizables para
este fin son mohos que pertenecen al género Absidia.
Son cepas tipo que no han sido conocidas como capaces
de producir en gran cantidad alfa-galactosidasa y en
pequeña cantidad invertasa. Sus nombres científicos,
20 con cita del nombre del autor, son los siguientes:

(1) Absidia lichtheimi (Lucet y Costantin)

Lendner (IFO 4009)

(2) Absidia lichtheimi (Lucet y Costantin)

Lendner (IFO 4010)

25 (3) Absidia reflexa, van Tieghem (IFO 5874)

405697



- (4) Absidia hyalospora (Saito) Lendner
(IFO 8082)
- (5) Absidia ramosa (Vuillemin) Lendner
(IFO 8083)
- 5 (6) Absidia regnierie (Lucet y Constantin)
Lendner (IFO 8084)

"IFO" es una abreviatura del nombre de la
compañía del Instituto for Fermentation, Osaka, de 54,
4 chome, Jusco Nishinomachi, Higashi-Yodogawa-ku, Osa-
10 ka, Japón.

Quando un moho perteneciente al género Absi-
dia es cultivado en un medio de cultivo que incorpora,
como inductor, al menos un miembro seleccionado del
grupo que consiste en lactosa, melibiosa, rafinosa y
15 galactosa en presencia de un manantial de carbono, un
manantial de nitrógeno y un manantial de mineral, se
puede producir de modo eficaz un preparado de enzima
deseado que tiene una fuerte actividad de alfa-galacto-
sidasa y muy débil actividad de invertasa, principalmen-
20 te dentro de los micelios del microorganismo. Es apro-
piado que el inductor sea añadido usualmente en el mar-
gen de 0,5% a 1,5% en peso del medio de cultivo. Cuan-
do el aditivo se encuentra en el margen de más de 1,5%
en peso, el tiempo de cultivo se hace largo y por lo
25 tanto este método no es económico.



Generalmente, la glucosa se utiliza como manantial de carbono. También, sustancias utilizadas como inductor pueden ser utilizadas como manantial de carbono para favorecer el crecimiento de los micelios, aunque es deseable incorporar glucosa o algún otro manantial de carbono apropiado en el medio además del inductor antes mencionado. Los manantiales de nitrógeno que se pueden utilizar para el medio de cultivo incluyen manantiales orgánicos de nitrógeno tales como líquido de maceración de maíz, malta, extracto de malta, residuos de malta, extracto de levadura, peptona, extracto de salvado de arroz, torta de pescado y maíz y manantiales inorgánicos de nitrógeno. Para el favorecimiento del crecimiento de los micelios es preferible utilizar un manantial inorgánico de nitrógeno en combinación con un manantial orgánico de nitrógeno. Particularmente, el líquido de maceración de maíz es fácil de manipular debido a su fluidez. Los manantiales de minerales que prueban ser eficaces para el presente medio son los que se encuentran en uso común, tales como sulfato de magnesio, fosfato de potasio y cloruro de sodio. Además de los arriba mencionados, se pueden añadir al medio, según lo exija la ocasión, biotina o algún otro acelerador del crecimiento apropiado. La adición de dicho acelerador del crecimiento no es necesaria.

405697

- 3 00



ria cuando se incorpora un manantial orgánico de nitro-
geno. En lo que concierne a las condiciones de la ope-
ración de cultivo para permitir al microorganismo in-
ducir eficazmente la formación de alfa-galactosidasa y
5 gozar de un crecimiento acelerado, el valor del pH del
medio puede oscilar generalmente entre 4 y 8, del modo
más preferible entre 5 y 7. La temperatura y el periodo
de cultivo dependen en cierto grado de la clase de mi-
croorganismo que se ha de utilizar y de la composición
10 del medio de cultivo. Generalmente, en el caso de efec-
tuarse el cultivo con agitación, un tiempo de cultivo
de 40 a 60 horas es suficiente a una temperatura de cul-
tivo de aproximadamente 30°C. Considerando que la va-
riedad utilizadora de rafinosa *Mortierella vinacea* re-
15 quiere aproximadamente 72 horas de tiempo de cultivo,
el presente cultivo permite una marcada reducción del
tiempo de cultivo.

Después de que se ha completado la opera-
ción de cultivo del microorganismo en las condiciones
20 antes mencionadas, los micelios del microorganismo son
recuperados por filtración de la solución de cultivo
por un método conocido. Para preparar la enzima en la
forma líquida o en la forma de polvo, los micelios fil-
trados son lavados con agua y luego sometidos a trata-
25 miento por un método de trituración o un método de



autólisis. La enzima extraída consiguientemente de los micelios puede ser luego tratada según se requiera y puede ser utilizada como el preparado de enzima.

5 Los micelios filtrados o el preparado de enzima obtenido de este modo pueden ser añadidos directamente a melazas de remolacha y la rafinosa contenida en éstas puede ser descompuesta. En otro modo, en el caso de los micelios filtrados que contienen enzima, los micelios pueden ser cargados en una columna o dispuestos
10 en un recipiente y las melazas de remolacha pueden ser hechas pasar de modo continuo a su través para descomponer la rafinosa.

Dado que la actividad de enzima por unidad de peso es notablemente alta tal como se ha mencionado
15 anteriormente, incluso si, por ejemplo, se utilizan melazas de remolacha que tienen una alta concentración de aproximadamente 50^o Brix, se puede descomponer de modo suficiente la rafinosa. Correspondientemente, las melazas de remolacha tomadas del proceso de obtención
20 de azúcar de remolacha pueden ser tratadas para la descomposición de rafinosa tal como están, sin apenas dilución, y la solución descompuesta puede ser devuelta al proceso sin apenas concentración. Por lo tanto, el método es muy económico.

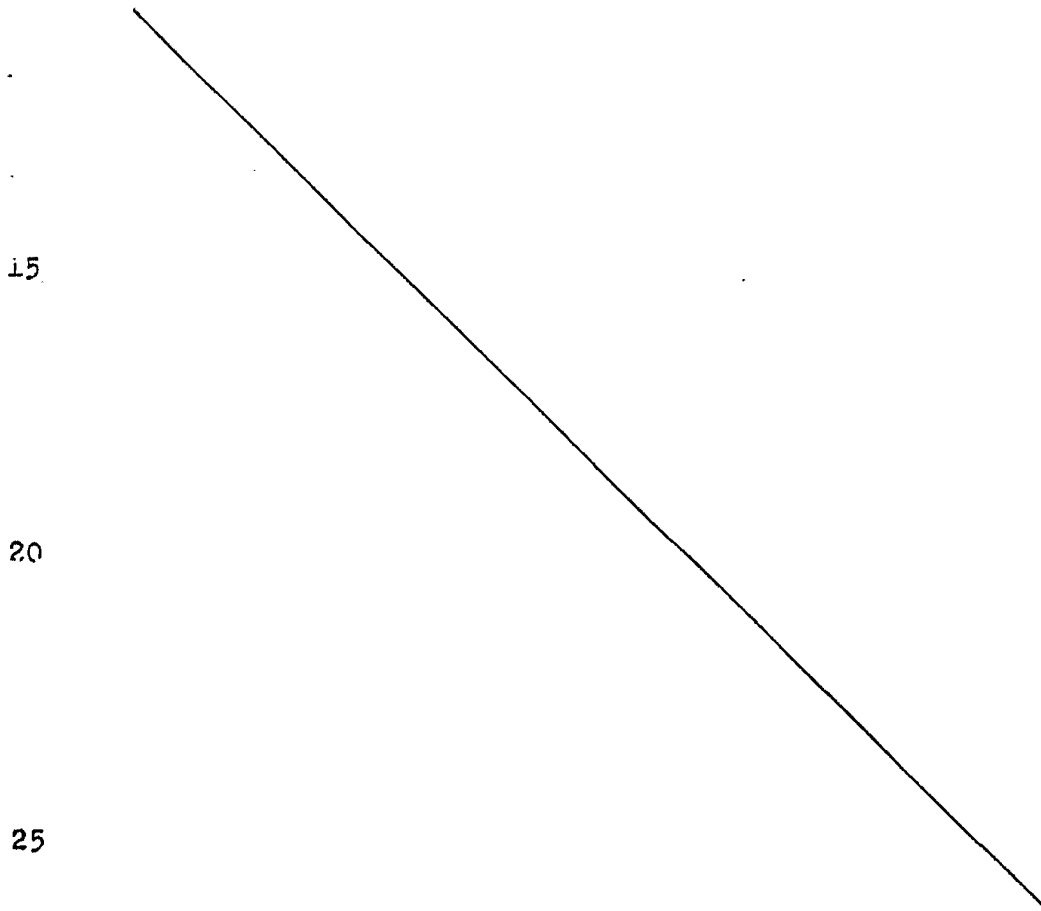
25 La temperatura para descomponer la rafinosa

405697



antes mencionada contenida en melazas de remolacha es de 20°C a 70°C, del modo más preferible de 30°C a 60°C. El valor del pH de melazas de remolacha oscila entre 4 y 7, del modo más preferible entre 5 y 6.

5 Seguidamente, las propiedades del preparado de enzima obtenido a partir del moho de género Absidia de acuerdo con el presente invento son comparadas en la Tabla 1 con las propiedades del preparado de enzima obtenido a partir de un moho del género Mortierella an
10 teriormente propuesto por los inventores.



405697



Tabla 1

	Mortierella vinacea variedad utilizado- ra de rafinosa	Absidia reflexa IFO 5.874
Actividad de alfa-galactosidasa/ g de micelios secos	207 x 10 ⁴ (unidades)	446 x 10 ⁴ (unidades)
Actividad de invertasa/g de mi- celios secos	15.000 (unidades)	6.538 (unidades)
Peso de micelios secos que tie- nen 100 x 10 ⁴ unidades de alfa- -galactosidasa	483 (mg)	224 (mg)

Peso de micelio requerido para la des-
composición de rafinosa en melazas.

	Mortierella vinacea variedad utilizado- ra de rafinosa (g)	Absidia reflexa (g)
Brix 20° (que contiene 3,86 g de rafinosa)	5,6	2,6
Brix 30° (que contiene 5,8 g de rafinosa)	8,4	3,9
Brix 40° (que contiene 7,74 g de rafinosa)	11,2	5,2
Brix 50° (que contiene 9,66 g de rafinosa)	14,0	6,5
Brix 60° (que contiene 11,6 g de rafinosa)	16,8	7,8

Tal como resulta evidente de la Tabla 1, se re-
quieren aproximadamente 1.150 x 10⁴ unidades de alfa-ga-
25 lactosidasa para un tratamiento eficaz de unas melazas

405697



1972

con 20° Brix que contienen 3,86 g de rafinosa. La actividad de alfa-galactosidasa obtenida de un moho de género *Mortierella vinacea* variedad utilizadora de rafinosa por un método ordinario es de 207×10^4 unidades, sugiriendo que se requiere en el caso de este tratamiento la adición de 5,6 g de micelios (sobre base seca). La actividad de alfa-galactosidasa obtenida por el método de este invento es de 446×10^4 unidades y, por lo tanto, es suficiente la adición de 2,6 g de micelios.

10 La diferencia en la cantidad de micelios a añadir se hace manifiesta de modo proporcional al aumento del grado Brix. Con 60° Brix, esta diferencia es de 9 g.

El método de este invento proporciona una actividad de alfa-galactosidasa por unidad de peso de micelios, marcadamente mejorada, tal como arriba se menciona y, por lo tanto, permite un ahorro proporcional en el consumo de enzima. Por lo tanto, el método de este invento no sólo prueba meramente ser altamente económico sino que facilita el subsiguiente tratamiento de la solución de descomposición y hace posible una disminución del volumen del recipiente de descomposición. El método mediante el cual el microorganismo del presente invento es cultivado para la inducción de alfa-galactosidasa es bastante ventajoso, dado que el tiempo de cultivo es más corto que el necesario para los

15
20
25



microorganismos convencionales.

Ahora, el invento se describe con más detalle en lo que sigue con referencia a ejemplos preferidos, que solamente se citan con fines de ilustración y no
5 deberán ser considerados de ninguna manera como limitativos del invento.

Ejemplo 1.

Se añadieron los sacáridos enumerados en la
10 Tabla 2, cada uno en cantidad de 1%, a diferentes porciones de un medio de cultivo básico que incorporaba 1% de glucosa, 1% de líquido de maceración de maíz, 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% de NaCl y 0,3% de CaCO_3 . Esporas de la especie *Absidia*
15 *reflexa* (IFO 5.874) fueron inoculadas en el medio de cultivo resultante y sometidas a cultivo con agitación a 30°C durante 72 horas sobre un agitador hecho funcionar a una velocidad de 140 rpm. Al final de la
operación de cultivo, cada una de las soluciones de
20 cultivo fue filtrada para separar los micelios. Los micelios separados fueron lavados a fondo con agua. Luego, los micelios fueron colocados en un mortero, sometidos a fricción juntamente con arena de mar hasta que la mezcla adoptó una forma pastosa, y fueron suspendi-
25 dos en agua destilada que tenía el mismo volumen que

405697



la solución de cultivo. La suspensión, tomada como solución de enzima, fue ensayada en cuanto a actividad de alfa-galactosidasa. Los valores de actividad de alfa-galactosidasa que están dados en la Tabla 2 son los determinados en términos de actividad de enzima de los micelios obtenidos a partir de 1 ml de medio de cultivo. La actividad de enzima de la suspensión de micelios fue determinada añadiendo 1 ml de suspensión de micelios a una mezcla de 0,5 ml de melibiosa 0,06 M y 0,5 ml de solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 5,2) para permitir que se desarrollase la reacción a 40°C durante dos horas, calentando después de ello la mezcla de reacción en un baño de agua hirviendo durante cinco minutos para inactivar la enzima, añadiendo a la solución de reacción 1 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ al 1,8% y 1 ml de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 2% para desproveer a la solución de proteínas, centrifugando la solución, y analizando la porción sobrenadante en cuanto a contenido de glucosa por el proceso de glucoestado. En consideración al hecho de que la cantidad de glucosa liberada a partir de melibiosa y la concentración de enzimas están en una relación proporcional hasta 1.000 μg de glucosa, la suspensión fue diluida de antemano de modo que pudiera caer en el margen de medición que satisface esta relación. La cantidad de glucosa libre fue multiplicada por el número de dilucio-

405697

-3



nes. La actividad de alfa-galactosidasa que libera 1 μ g de glucosa en las condiciones arriba mencionadas fue tomada como 1 unidad.

Tabla 2

Hidrato de carbono	Unidades de alfa-galactosidasa
Xilosa	0
Arabinosa	0
Ramnosa	0
Glucosa	0
Mannosa	0
Fructosa	0
Galactosa	14.900
Maltosa	0
Celobiosa	0
Lactosa	53.800
Melibiosa	14.340
Sacarosa	0
Rafinosa	37.240
Almidón soluble	0
Dextrana	0

Los resultados mostrados en esta tabla indican con claridad que la galactosa, la melibiosa, la rafinosa y la lactosa son máximamente eficaces para la

405697



producción de alfa-galactosidasa y que la lactosa proporciona los mejores resultados.

Ejemplo 2.

5 Esporas de las cepas enumeradas en la Tabla
3 fueron inoculadas en diferentes porciones de un medio
de cultivo que incorporaba 1% de lactosa, 1% de gluco-
sa, 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% de líquido de maceración de
maíz, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% de NaCl
10 y 0,3% de CaCO_3 y fueron cultivadas de la misma manera
que en el Ejemplo 1. Las soluciones de cultivo resul-
tantes fueron analizadas en cuanto a actividad de alfa-
-galactosidasa de los micelios y a actividad de inver-
tasa de los micelios. La actividad de invertasa fue de
15 terminada combinando 1 ml de suspensión de micelios
con 0,5 ml de sacarosa 0,06 M y 0,5 ml de solución tam-
pón de fosfato 0,1 M (pH 5,0) para permitir que se de-
sarrollase la reacción en las mismas condiciones que
se emplearon para la determinación de actividad de al-
20 fa-galactosidasa, centrifugando la solución para elimi-
nar proteínas y analizando la porción sobrenadante en
cuanto a contenido de azúcar invertido por el método
de Somogyi Nelson. La actividad de invertasa que produ-
jo 1 μg de azúcar invertido en las condiciones arriba
25 mencionadas fue tomada como 1 unidad. Los resultados es



tán mostrados en la Tabla 3. La actividad de invertasa dada en esta tabla representa la actividad de enzima de micelios obtenidos a partir de 1 ml de medio de cultivo.

5

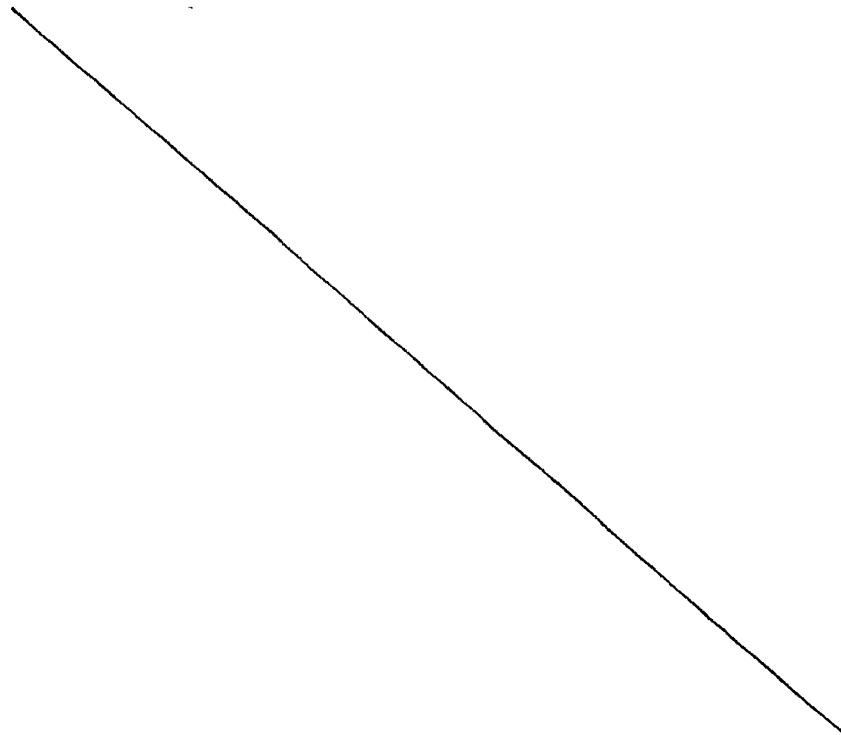
El peso de micelios secos, secando a 105°C la cantidad de micelios, se encontró que había crecido en 100 ml de medio de cultivo y pesando después de esto la masa seca de micelios. La actividad de alfa-galactosidasa por gramo de micelios secos está mostrada en la Tabla 3 bajo el epígrafe "alfa-galactosidasa/g de micelios secos". Similarmente, la actividad de invertasa está mostrada allí bajo el epígrafe "invertasa/g de micelios secos".

10

15

20

25



405697



Tabla 3

Cepa	Peso en seco de micelios en 100 ml (g)	Unidades de alfa-galactosidasa	Alfa-galactosidasa/g de micelios secos (unidades)	Unidades de invertasa	Invertasa /g de micelios secos
Absidia reflexa (IFO 5874)	1,3	58.000	446 x 10 ⁴	85	6.538
Absidia renierie (IFO 8084)	1,3	52.000	400 x 10 ⁴	84	6.461
Absidia hyalospora (IFO 8082)	1,35	65.000	481 x 10 ⁴	87	6.444
Absidia lichtheimi (IFO 4010)	1,40	79.000	564 x 10 ⁴	92	6.571
Absidia lichtheimi (IFO 4009)	1,40	72.000	514 x 10 ⁴	90	6.428
Absidia ramosa (IFO 8083)	1,30	39.000	300 x 10 ⁴	84	6.462
Mortierella vinacea variedad utilizadora de rafinosa. (ATCC 20034)	1,40	29.000	207 x 10 ⁴	210	15.000

27.9.72

- 18 -

405697



Para fines comparativos, esporas de Mortierella vinacea variedad utilizadora de rafinosa fueron cultivadas similarmente y fue analizada la solución de cultivo resultante. Los resultados están dados también en la Tabla 3. Resulta evidente de la tabla que las cepas del género Absidia dieron valores mucho más elevados de actividad de alfa-galactosidasa y valores menores de actividad de invertasa. Además, la actividad de alfa-galactosidasa poseída por 1 g de micelios secos era mayor y a la inversa, la actividad de invertasa era menor para las cepas del género Absidia que para la cepa de Mortierella vinacea.

Ejemplo 3.

En 10 litros de agua se disolvieron 120 g de lactosa, 120 g de glucosa, 120 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 g de líquido de maceración de maíz, 36 g de KH_2PO_4 , 24 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24 g de NaCl y 36 g de CaCO_3 . La solución fue dispuesta en un fermentador de jarra y esterilizada a 120°C durante 30 minutos, después de esto fue enfriada a 30°C y diluida con agua destilada esterilizada hasta un volumen total de 12 litros. La cepa de Absidia reflexa IFO 5.874 fue cultivada en la solución con agitación a 300 rpm., introduciéndose aire a una velocidad de 3 litros/minuto. Después de transcurrir los

405697

-3



intervalos de tiempo de cultivo indicados, se tomaron muestras y se analizaron en cuanto a actividad de alfa-galactosidasa y al valor de pH de la solución de cultivo. Los resultados están mostrados en la Tabla 4.

5

Tabla 4

Tiempo de cultivo (horas)	pH de la solución de cultivo	Unidades de alfa-galactosidasa
0	6,1	0
10 20	6,1	9.800
24	6,6	19.900
28	6,3	31.200
32	6,1	45.600
36	5,8	54.500
15 40	5,8	59.300
42	5,8	62.700
44	5,8	63.000

20

De la tabla resulta evidente que un tiempo de cultivo de 42 horas fue suficiente para la cepa de *Absidia reflexa* IFO 5.874. Al final de 42 horas de cultivo, el peso de micelios secos obtenidos a partir de 100 ml de medio de cultivo era de 1,30 g.

Ejemplo 4.

25

La cepa de *Absidia hyalospora* IFO 8082 fue

27.9.72

405697



cultivada en las mismas condiciones que en el Ejemplo 3. Se determinó la relación entre la duración del tiempo de cultivo y la cantidad de alfa-galactosidasa formada. Los resultados están mostrados en la Tabla 5.

5

Tabla 5

Tiempo de cultivo (horas)	pH de la solución de cultivo	Unidades de alfa-galactosidasa.
0	5,9	0
10	6	0
12	5,85	0
18	5,50	0
24	5,20	134
30	6,40	1.240
15	36	4.030
42	6,60	19.360
48	6,00	51.360
54	5,50	68.500
20	57	69.000

20

La Tabla muestra con claridad que un tiempo de cultivo de 54 horas fue suficiente para esta cepa. Al final de 54 horas de cultivo, el peso de micelios secos obtenidos de 100 ml de medio de cultivo era de 1,35 g.

25

27.9.72

405697



Ejemplo 5.

Melazas producidas por el procedimiento Steffen fueron diluidas con agua hasta 30° Brix y ajustadas a pH 5,2 por la adición de ácido sulfúrico. En 200 g
5 de la solución resultante (que contenía 5,8 g de rafinosa), los micelios de Absidia reflexa IFO 5874 (que tenían un peso en seco de 3,9 g y 17.400.000 unidades de alfa-galactosidasa) obtenidos en el Ejemplo 2 fueron hechos reaccionar a 50°C durante 2 horas y 30 minutos mientras se encontraban bajo agitación. Al final de la reacción,
10 los micelios fueron separados por filtración y lavados con agua. El producto filtrado y los líquidos de lavado fueron combinados. Un volumen prescrito de esta mezcla fue analizado por cromatografía en papel en cuanto a contenido residual de rafinosa y contenido aumentado de sacarosa. Para ser más específica, la muestra fue revelada en un disolvente que consistía en 6 partes de n-butanol, 4 partes de piridina y 3 partes de agua. La zona de rafinosa y la zona de sacarosa consiguientemente
20 te formadas fueron cortadas, separadas por lavado con agua y analizadas por el procedimiento de cisteína-carbazol. Se encontró que 78% del contenido original de rafinosa había sido descompuesto y que el contenido de sacarosa había aumentado en 2,41 g.

25

27.9.72



Ejemplo 6.

En 200 g de melazas de 30^o Brix preparados de la misma manera que en el Ejemplo 5, los micelios de Absidia reflexa IFO 5.874 (que tenían 17.400.000 unidades de actividad de alfa-galactosidasa) fueron hechos reaccionar por el mismo método que en el Ejemplo 5. Después de la reacción, los micelios fueron lavados con agua y los micelios lavados fueron añadidos a un nuevo suministro de melazas diluidas y hechos reaccionar. De esta manera, los micelios fueron usados repetidamente en un total de cinco tratamientos. Las soluciones de descomposición obtenidas en todos los tratamientos fueron analizadas en cuanto a contenido residual de rafinosa y en cuanto al aumento del contenido de sacarosa. Los resultados están mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6

Después del experimento N ^o	Aumento de sacarosa (g)	Descomposición de rafinosa (%)	Actividad de alfa-galactosidasa remanente (%)
1	2,45	78,5	90
2	2,58	79,0	88
3	2,41	77,8	86
4	2,37	76,0	86
5	2,41	75,1	84

405697



Ejemplo 7.

Melazas de Steffen fueron diluidas a 50° Brix y luego ajustadas a pH 5,2 con ácido sulfúrico. En 200 g de esta solución (que contenía 9,66 g de rafinosa),
5 los micelios de Absidia reflexa IFO 5874 (que tenían un peso en seco de 6,5 g y 28.980.000 unidades de actividad de alfa-galactosidasa) obtenidos en el Ejemplo 2 fueron hechos reaccionar a 50°C durante 2 horas y 30 minutos. Al final de la reacción, la solución de descom-
10 posición fue analizada en cuanto a la proporción de descomposición de rafinosa y al aumento de contenido de sacarosa. Se encontró que la proporción de descomposición de rafinosa era de 56,2% y el aumento de contenido de sacarosa era de 3,03 g.

15

Ejemplo 8

En 100 ml de melazas (que contenían 3,87 g de rafinosa) diluidas a 50° Brix y ajustadas a pH 5,2, los micelios de Absidia reflexa IFO 5874 (que tenían
20 un peso en seco de 1,734 g y 7.740.000 unidades de actividad de alfa-galactosidasa) fueron hechos reaccionar a 50°C durante 10 horas. Al final de la descomposición, el componente de micelios extraído de los micelios fue analizado a longitudes de onda de 280 m μ y
25 260 m μ . Para ser específica, la solución de descompo



sición fue filtrada y el filtrado fue diluido con agua hasta 1000 veces el volumen original y ensayado en cuanto a densidad óptica a 280 m/μ y 260 m/μ. Separadamente, los micelios de *Mortierella vinacea* variedad 5 utilizadora de rafinosa (que tienen un peso en seco de 3,730 g y 7.740.000 unidades de actividad de alfa-galactosidasa) fueron hechos reaccionar en las mismas melazas bajo las mismas condiciones que arriba se mencionan. La solución de descomposición fue ensayada en 10 cuanto a densidad óptica a longitudes de onda de 280 m/μ y 260 m/μ. Como un testigo, las melazas en su forma inalterada fueron ensayadas en cuanto a densidad óptica. Los resultados están mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7

15

	Testigo	<i>Mortierella vinacea</i> variedad utilizadora de rafinosa	<i>Absidia reflexa</i> IFO 5.874
Densidad óptica a 260 m/μ	0,414	0,515	0,430
20 Densidad óptica a 280 m/μ	0,302	0,348	0,310

La tabla indica que cuando las dos clases de micelios que poseían igual actividad de alfa-galactosidasa fueron utilizadas para la descomposición de rafi- 25

405697



nosa, la cantidad de componente de micelios extraídos era menor en el caso de Absidia reflexa IFO 5874.

Ejemplo 9.

5 Los micelios de Absidia reflexa IFO 5874
(que tenían 17.400.000 unidades de actividad de alfa-ga-
lactosidasa) obtenidos en el Ejemplo 2 fueron añadidos
a porciones de 200 g de jugo de remolacha (que contenían
cada uno 5,8 g de rafinosa) diluidas a 30º.Brix y ajustados a pH 5,2, y hechos reaccionar durante 3 horas a
10 las temperaturas de reacción que se muestran en la Ta-
bla 8. Al final de cada reacción, la solución de descom-
posición fue analizada en cuanto a la proporción de des-
composición de rafinosa. Los resultados están mostrados
15 en la Tabla 8.

Tabla 8

	Temperatura de reacción (°C)	Proporción de descomposición de rafinosa (%)
20	20	43,1
	30	75,7
	40	78,5
	50	80,2
	60	79,2
25	70	55,6

405697



Resulta evidente de la tabla arriba mencionada que cuando la temperatura de reacción es mayor de 30°C aumenta notablemente la proporción de descomposición de rafinosa, pero cuando aquella es mayor de 70°C disminuye la proporción debido a que la enzima está inactivada.

Ejemplo 10.

Los micelios de Absidia reflexa IFO 5.874 (que tenían 17.400.000 unidades de actividad de alfa-galactosidasa) fueron añadidos a porciones de jugo de remolacha diluidas a 30° Brix utilizando solución tampón de McIlvaine y ajustadas a los niveles de pH mostrados en la Tabla 6 y fueron hechos reaccionar a 50°C durante 3 horas. Al final de la descomposición, la solución de descomposición fue analizada en cuanto a la proporción de descomposición de rafinosa.

Tabla 9

pH	Proporción de descomposición de rafinosa (%)
3	11,5
4	68,2
5	80,2
6	77,4

27.9.72

405697

-30



{continuación tabla 9}

	pH	Proporción de descomposición de rafinosa (%)
5	7	39,2
	8	19,0

De la tabla antes mencionada resulta evidente que los resultados preferibles se obtuvieron en el margen de valores de pH de 4 a 8.

10 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, con fecha 30 de Marzo de 1.972, bajo el Número 239.741, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

20

- REIVINDICACIONES -

25

Los puntos de invención, propia y nueva,

27.9.72

- 28 -

405697



que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años, son los siguientes:

5 1.- Un método mejorado para descomponer la ra
finosa contenida en el zumo de remolacha o en melazas
de remolacha, en galactosa y sacarosa por utilización
de alfa-galactosidasa producida a partir de microorga-
nismos, caracterizado porque la mejora comprende culti-
var un moho perteneciente al género Absidia en un medio
10 de cultivo que incorpora en él, al menos un azúcar del
grupo consistente en lactosa, melibiosa, rafinosa y ga-
lactosa en el margen de 0,5% a 1,5% en peso del medio
de cultivo, y tratar dicho jugo de remolacha o melazas
de remolacha con la alfa-galactosidasa producida.

15 2.- Un método mejorado para descomponer la
rafinosa contenida en el zumo de remolacha o en mela-
zas de remolacha, en galactosa y sacarosa.

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

20

25

27.9.72

- 29 -

405697



Esta Memoria consta de treinta hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, -3 OCT. 1972

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poderes *Arta*

27.9.72/RTA.-

27.9.72

- 30 -

Arta