

S/Ref.: Case G-14

N/Ref.: O.G. 23.571.-MY.



'407544

407544¹¹⁰

PATENTE DE INVENCION

Int. Cl.: C 12 D

MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

"MEJORAS EN UN METODO DE PRODUCCION DE PULULANO"

Solicitante: La Compañía japonesa: HAYASHIBARA BIOCHEMICAL
LABORATORIES, INCORPORATED, con domicilio en:
No. 2-3, 1-chome, Shimoishii, Okayama-shi,
Okayama-ken, (Japón).

Inventores: Koso Kato y

Makoto Shiosaka, ambos japoneses.

20 8 7 6

407544



Extracto del descubrimiento

Se produce el pululano por fermentación aeróbica, microbiana de hidrolizado del almidón que tiene un equivalente de dextrosa (D.E.) de 20 - 70 con rendimientos superiores a los conseguidos hasta ahora por fermentación de la sucrosa o glucosa, que son fuentes de carbono más costosas.

5.

Esta invención se refiere al pululano, y particularmente a un método de producción del pululano por cultivo de microorganismos apropiados en un medio de cultivo conteniendo un sacárido como fuente de carbono principal.

10.

El pululano es un polisacárido en el que las unidades de maltotriosa están conectadas por enlaces α -1,6. Se disuelve fácilmente en el agua formando soluciones viscosas. Se puede preparar películas hidrosolubles útiles como materiales de embalaje a partir de las soluciones de un modo conocido, y se puede usar el pululano como anti-coagulante para la sangre del mismo modo que el dextrano. Su producción microbiana por medio de Pullularia pullulans fue descubierta por R. Bauer en 1.938, su estructura ha sido establecida por H. Bender y otros (Biochim. Biophys. Acta 36 [1959] 309).

15.

20.

En la preparación del pululano por fermentación microbiana, la sucrosa constituía hasta ahora la fuente de carbono más frecuentemente utilizada y más ventajosa. El uso de monosacáridos (glucosa, fructosa, mannososa) y de disacáridos distintos de la sucrosa (maltosa) ha sido investigado, pero tales fuentes de carbono alternativas dieron generalmente una producción de pululano inferior a la sucrosa en la práctica. Incluso la sucrosa no podía ser convertida usualmente en pululano con un rendimiento superior al 12%

25.

30.



o 28%, y el coste del pululano así producido no era interesante.

- Se ha descubierto ahora que el almidón parcialmente hidrolizado es no solamente una fuente de carbono más barata que la sucrosa y otros azúcares usados hasta ahora, sino que produce además mayor cantidad de pululano. El almidón hidrolizado empleado como fuente principal o única fuente de carbono importante en los medios de cultivo de la invención tiene un equivalente de dextrosa (D.E.) de 20 a 70, y preferentemente de 35 a 60. Se obtiene fácilmente por hidrolización del almidón en presencia de un ácido o una enzima, y se convierte en pululano por medio de microorganismos productores de pululano con rendimientos tan elevados como del 75% o incluso más. El almidón parcialmente hidrolizado consiste principalmente o enteramente en dextrinas u oligosacáridos.
- 5.
- 10.
- 15.

- Los microorganismos productores de pululano apropiados para ser cultivados sobre medios que contienen almidón parcialmente hidrolizado como fuente de carbono son varias cepas de Pullularia, tal como *P. fermentans* var *fermentans* IFO 6401, *P. fermentans* var *fusca* IFO 6402, *P. pullulans* AHU 9553, *P. pullulans* IFO 6353, también *Dematium pullulans* IFO 4464, y otras que podrán ser seleccionadas fácilmente basándose en su facultad para convertir el almidón parcialmente hidrolizado de un equivalente de dextrosa de 20 a 70 en pululano que tenga un grado de polimerización apropiado para la aplicación perseguida. Si se desea obtener un producto incoloro, la cepa microbiana empleada debería ser seleccionada de acuerdo con ello, ya que la naturaleza de los microorganismos afecta al peso molecular medio
- 20.
- 25.
- 30.



del pululano obtenido y al grado en que está contaminado con materia colorante.

- El almidón empleado como material de partida para la hidrólisis parcial puede ser elegido libremente. Se ha obtenido buenos resultados con almidones de cereales, tales como los de maíz en grano, maíz parafinado, o trigo, pero también con almidones derivados de raíces o tubérculos, tales como las patatas, batatas, o tapioca. Cuando la materia prima sólo consiste parcialmente en almidón, tal como la harina de arroz, salvado de arroz, cáscara de maíz, y similares, se prefiere licuar el contenido de almidón de tales materiales por medio de α -amilasa a la temperatura más baja posible (50° - 70° C) y filtrar la solución acuosa así obtenida para retirar el material insoluble.
5. Se puede preparar un jarabe de almidón hidrolizado apropiado para la fermentación de acuerdo con esta invención por medio de un ácido o una enzima de un modo básicamente conocido. La hidrólisis debe ser realizada de tal modo que se evite un producto que tenga un equivalente de dextrosa inferior a 20 que puede contener dextrina sin reaccionar.
10. Típicamente, se mezcla una pasta de almidón en agua con suficiente ácido oxálico y/o clorhídrico para rebajar el pH a 2,0 o menos, y se calienta la mezcla a 120° C o a una temperatura superior hasta obtener el equivalente de dextrosa deseado. La solución resultante es refrigerada a temperatura ambiente, neutralizada con carbonato cálcico y/o carbonato sódico, decolorada con carbón activo, y desionizada por medio de una resina cambiadora de iones como es en sí convencional. El líquido incoloro puede ser empleado como base para un medio de cultivo, y su contenido de agua puede ser ajustado por eva-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



poración o dilución, si es necesario.

- Alternativamente, se lleva a cabo la hidrólisis ácida solamente hasta la licuación del almidón, y la solución es posteriormente sacarificada por medio de α -amilasa a
5. 60° - 70° C. También es posible hidrolizar el almidón por medio de α -amilasa solamente. La hidrólisis ácida o la combinación de hidrólisis ácida y enzimática permite producir jarabes de almidón que tienen valores de equivalente de dextrosa de 50 o más elevados, mientras que un equivalente de dextrosa de no más de 35 es el límite que puede ser alcanzado por
10. la α -amilasa sola. Se puede preparar un hidrolizado que tiene un equivalente de dextrosa de hasta 50 licuando el almidón por medio de ácido o α -amilasa y tratando después el producto con malta-amilasa. Se puede preparar un jarabe de almidón
15. conteniendo mucha maltosa haciendo uso simultáneo de iso-amilasa y malta-amilasa, seguido de la purificación del hidrolizado como se describe más arriba.

- La concentración del almidón parcialmente hidrolizado en el medio de cultivo debería ser del 3 al 30%, y está
20. comprendida con preferencia entre el 5 y 15% para obtener mejores rendimientos de pululano, siendo todos los valores en porcentaje que se indican en esta descripción en peso a menos que se especifique lo contrario. A concentraciones de más del 15%, se alarga el período de incubación necesario y se aumenta
25. la cantidad de azúcar residual. A concentraciones inferiores al 5%, la recuperación del pululano precisa la dilución del medio de cultivo con una cantidad excesiva de un disolvente orgánico hidrosoluble en el que el pululano es insoluble. El rendimiento de pululano basado en el peso de sacárido en el
30. medio decrece con la concentración de azúcar, pero aumenta



cuando está basado en el volumen del medio.

5. El medio de cultivo debe contener otros nutrientes, en sí convencionales y necesarios para el crecimiento de los microorganismos, tales como una fuente de nitrógeno asimilable, que puede ser un compuesto orgánico o inorgánico, y nutrientes menores tales como fuentes de iones inorgánicos, por ejemplo, fosfato potásico, cloruro sódico, sulfato magnésico, sulfato ferroso, y similares.

10. El valor de pH inicial preferido del medio de cultivo está comprendido entre 5,0 y 7,5 y la temperatura de incubación preferida es de 27° a 30° C. Se alcanza usualmente la concentración de pululanó más elevada en tres a ocho días, y se logra el rendimiento de pululano más elevado cuando el cultivo puede ser continuado hasta que no queda azúcar residual. El grado de polimerización del pululano tiende a decrecer cuando se aumenta el tiempo de incubación, y el cultivo puede tener que ser interrumpido antes de lograr el rendimiento más alto si se precisa obtener un producto de alto peso molecular. El medio de cultivo puede ser aireado de cualquier modo deseado y usual, y no se ha observado que las condiciones de aireación tengan un efecto importante sobre el resultado del método.

25. Al completar la incubación, se calienta el medio de cultivo para desactivar la enzima presente, y las células microbianas son retiradas del medio líquido, preferentemente por centrifugación. Se añade metanol u otro disolvente orgánico fácilmente soluble en el agua e incapaz de disolver el pululano al licor libre de células en una cantidad apropiada para precipitar el pululano. Se mezcla habitualmente cantidades iguales de licor y metanol para tal fin si se lleva a cabo la
- 30.



fermentación bajo las condiciones preferidas.

5. El pululano precipitado es recuperado del licor y purificado por disolución repetida en agua y precipitación por medio del disolvente orgánico. El pululano purificado es un polvo blanquecino que se disuelve muy fácilmente en el agua para formar soluciones viscosas.

10. El grado medio de polimerización del pululano preparado por el método de la invención ha resultado ser de aproximadamente 1.000 a 3.000 según ha sido determinado por medio de ácido 3,5-dinitrosalicílico. El producto de la hidrólisis por medio de la pululanasa forma una mancha característica de maltotriosa en un cromatograma de papel, y el producto de la hidrólisis ácida muestra también una mancha característica de glucosa.

15. El rendimiento de pululano se ve afectado por la naturaleza, equivalente de dextrosa y la concentración de la fuente de carbono según será demostrado por los resultados de los ensayos comparativos.

Efecto de la naturaleza de la fuente de carbono

20. Se prepararon medios de cultivo para contener 10% de fuente de carbono, 0,2% de peptona, 0,2% cada uno de K_2HPO_4 y NaCl, 0,04% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, y 0,001% de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Se dispusieron tandas de 100 ml de los diversos medios en frascos de 500 ml, se inocularon con microorganismos productores de pululano, y se cultivaron sobre un agitador rotativo a un pH de 7,5 y a 28°C durante siete días.
- 25.

30. Los rendimientos conseguidos, en porcentaje de conversión de las fuentes de carbono, están indicados en la Tabla 1, en la que las fuentes de carbono son identificadas por números:



5. (1) glucosa
 (2) sucrosa
 (3) 90% maltotriosa (D.E. 60,5)
 (4) almidón hidrolizado por ácido a un D.E. de 45
 (5) almidón hidrolizado por enzimas a un D.E. de 35.

Los microorganismos empleados son identificados por letras mayúsculas:

10. (A) Pullularia pullulans AHU 9553
 (B) Pullularia pullulans IFO 6353
 (C) Dematium pullulans IFO 4464

T A B L A 1

	(A)	(B)	(C)
15. (1)	35%	31%	43%
(2)	51%	35%	54%
(3)	62%	51%	61%
(4)	65%	76%	75%
(5)	63%	63%	72%

20.

Efecto del equivalente de dextrosa

25. Se hidrolizó el almidón por medio de ácido a unos valores de equivalente de dextrosa de 25 a 70, y por medio de enzima a valores comprendidos entre 25 y 40. Los diversos productos de almidón hidrolizado fueron fermentados bajo las condiciones de los ensayos precedentes por medio de la cepa (C), y los rendimientos conseguidos para los dos tipos de hidrolizado son mostrados en la Tabla 2, en porcentaje.

30.

407544

- 9 -

T A B L A 2

Equivalente de dextrosa	25	30	40	50	60	70
% de almidón hidrolizado con ácido	45	53	68	76	75	58
% de almidón hidrolizado con enzimas	47	58	65	-	-	-

Como resulta evidente por la Tabla 2, se consiguen los mejores resultados a valores de equivalente de dextrosa de aproximadamente 40 - 60. A un equivalente de dextrosa de más de 60, decrece el rendimiento por la predominancia de glucosa o maltosa en la fuente de carbono. A un equivalente de dextrosa de menos de 40, desciende el rendimiento porque la dextrina de la fuente de carbono no se convierte fácilmente en pululano.

15. Efecto de la concentración de la fuente de carbono

Se cultivó la cepa (C) como en los ensayos precedentes sobre medios de cultivo que se diferenciaban entre sí en la concentración de la fuente de carbono que era almidón hidrolizado con ácido de un equivalente de dextrosa de 45 o bien almidón hidrolizado con enzimas de un equivalente de dextrosa de 40. Los resultados, en porcentaje de conversión de la fuente de carbono, están indicados en la Tabla 3.

T A B L A 3

Concentración de la fuente de carbono	5%	10%	15%	25%	30%
Almidón hidrolizado con ácido, D.E. 45	65	75	73	55	50
Almidón hidrolizado con enzimas, D.E. 40	63	72	70	60	54

A concentraciones inferiores al 5%, una porción predominante de los sacáridos disponibles se consume para el



crecimiento de los microorganismos. A concentraciones superiores al 15%, el período de incubación debe ser ampliado para reducir la cantidad de azúcar residual. En cualquier caso, desciende el rendimiento de pululano.

5. Los ejemplos que siguen son igualmente ilustrativos del método de la invención.

EJEMPLO 1

10. Se cultivó *Dematium pullulans* IFO 4464 sobre medios que tenían la composición básica descrita anteriormente en el ensayo sobre el efecto de la naturaleza de la fuente de carbono, usando las fuentes de carbono identificadas aquí por los números (1) a (4), y una fuente de carbono (5a) que se diferenciaba del hidrolizado de almidón (5) por tener un equivalente de dextrosa de 40.

15. Se dispusieron las respectivas tandas de 100 ml de los diversos medios en frascos de 500 ml, se esterilizaron a elevada temperatura, y se inocularon con el microorganismo que había sido cultivado previamente sobre superficies inclinadas por espacio de dos días y en cultivos de semillas durante dos días. Se realizó el cultivo a 27° C y a un pH de 7,5 con agitación durante siete días.

20. Se recogieron muestras de cada medio de cultivo después de 3, 5 y 7 días y se centrifugaron. Cada material flotante desprovisto de células fue diluido con tres volúmenes de metanol para precipitar los polisacáridos presentes que fueron purificados dos veces por disolución en pequeñas cantidades de agua y nueva precipitación con metanol. Los precipitados finales fueron lavados con metanol, secados, y pesados. Fueron identificados como pululano por hidrólisis con pululanasa y cromatografía sobre papel del hidrolizado.
- 25.
- 30.

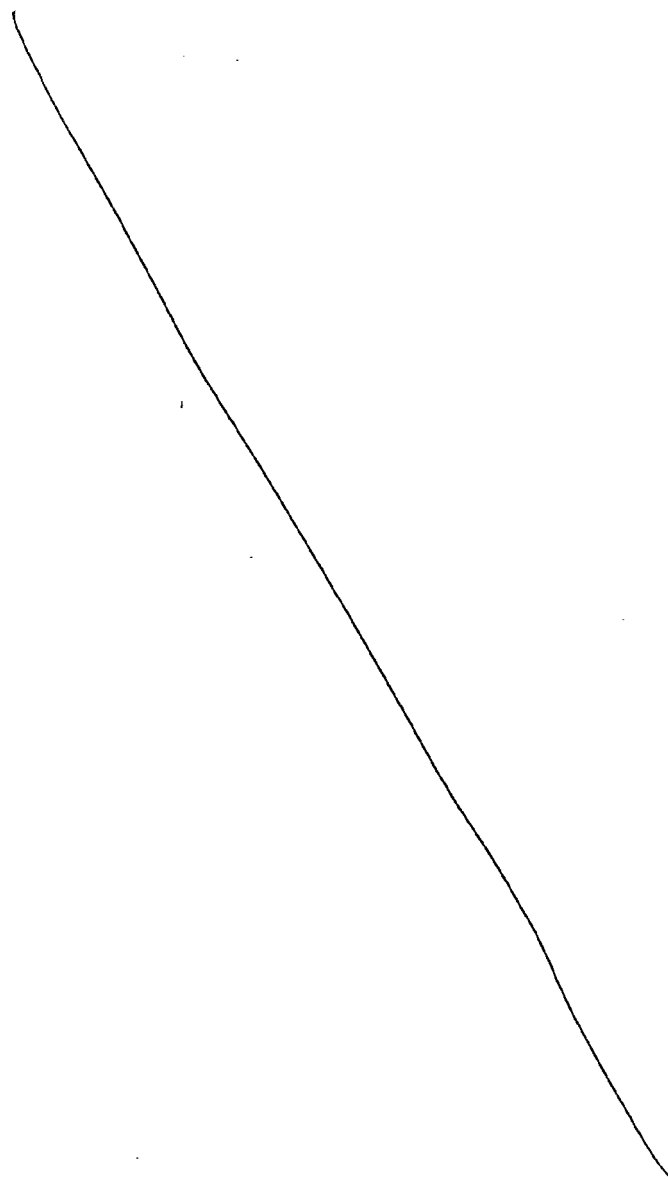
407544



La turbidez de cada muestra fue medida después de 3 y 7 días después de la dilución con nueve volúmenes de agua, y se determinó también el pH del medio después de 3 y 7 días. Se determinó el azúcar residual en los medios de cultivo después de 3, 5 y 7 días, y está indicado en la Tabla 4 que sigue en gramos por 100 ml. La Tabla muestra las medias de las determinaciones para cada valor enumerado.

10.

15.





11

II A B I A 4

Días después	pH		Turbidez		Azúcar residual			Rendimiento, %		
	3	7	3	7	3	5	7	3	5	7
(1)	4,2	4,8	0,8	1,5	5,8	3,2	0,5	21	32	43
(2)	4,2	4,2	0,7	1,4	5,1	1,2	0,3	30	45	54
(3)	4,2	4,6	0,97	2,0	6,5	3,1	0,5	10	32	61
(4)	4,2	4,4	0,9	1,9	5,5	1,8	0,1	38	67	75
(5a)	4,2	4,2	0,9	1,8	5,1	2,0	0,3	35	65	72

407544

12

1970



EJEMPLO 2

Se cultivó Pullularia pullulans AHU 9553 bajo las condiciones del ejemplo 1 sobre medios de cultivo conteniendo respectivamente las siguientes fuentes de carbono:

- 5. (1) glucosa
- (2) sucrosa
- (6) maltosa
- (7) almidón hidrolizado en dos fases por medio de ácido y enzimas a un equivalente de dextrosa de 46.
- 10. (8) almidón hidrolizado por ácido a un equivalente de dextrosa de 43.

La Tabla 5 indica los valores de azúcar residual y rendimiento de pululano obtenidos con los diversos medios.

- 15. El pululano obtenido estaba ligeramente coloreado, y el rendimiento del mismo era algo inferior al del ejemplo 1 bajo condiciones por otra parte comparables.

T A B L A 5

20.	(1)	(2)	(6)	(7)	(8)
Azúcar residual, gr/100 ml.	1,7	1,1	2,1	0,8	0,5
Rendimiento de pululano, %	35	51	62	63	65

25. EJEMPLO 3

Se cultivó Pullularia pullulans IFO 6353 sobre los medios de cultivo y bajo las condiciones reseñadas en el ejemplo 1 con la excepción de un período de incubación de cinco días solamente. Los rendimientos de pululano fueron más

30. bajos que los rendimientos máximos del ejemplo 1 a causa del



período de incubación más corto, pero los almidones hidrolizados parcialmente produjeron todavía del 25% al 30% más de pululano que la sucrosa o glucosa. El pululano obtenido era de color más claro que en el ejemplo 1 y era fácilmente soluble en agua fría. Fue identificado por hidrólisis con pululanasa y cromatografía sobre papel como se ha descrito más arriba. La viscosidad de las soluciones era mucho más baja que la de las soluciones correspondientes preparadas a partir de los pululanos del ejemplo 1.

10.

EJEMPLO 4

Se inculó *Pullularia pullulans* var fusca IFO 6402 sobre un medio generalmente tal como ha quedado descrito en el ejemplo 1 y conteniendo 15% de almidón hidrolizado con ácido de un equivalente de dextrosa de 35 como única fuente de carbono importante. Después de la incubación por espacio de ocho días con agitación a 27° C, no había azúcares residuales presentes, y la enzima fue inactivada por calentamiento. Las células fueron retiradas, y el pululano se precipitó a partir del licor desprovisto de células añadiendo tres volúmenes de metanol. El precipitado fue recuperado y purificado por disolución repetida en agua y precipitación con metanol.

20.

Se mezcló una solución al 10% de pululano purificado en agua con 200 unidades de pululanasa extraídas de un cultivo de *Aerobacter*. La mezcla fue decolorada con carbón activo, desionizada por medio de una resina cambiadora de iones, y parcialmente evaporada hasta obtener un jarabe incoloro. El producto era maltotriosa pura de acuerdo con su poder reductor y el resultado del análisis cromatográfico. El rendimiento de maltotriosa fue del 95%.

25.

30.

Se dispuso una solución acuosa al 30% de la malto-



- triosa en un autoclave con 0,3% de carbonato cálcico y 10% de níquel Raney basados en los sólidos presentes en la solución. La maltotriosa fue hidrogenada a 100° C a una presión de hidrógeno de 100 kg/cm². La mezcla de hidrogenación fue
5. filtrada para retirar el catalizador, y el filtrado decolorado y desionizado como se ha descrito más arriba. El líquido incoloro estaba falto de poder reductor y dio glucosa y sorbitol en una relación molar de 2:1 cuando fue hidrolizado. El producto de la hidrogenación era pues maltotriol, y fue
10. obtenido a partir de maltotriosa con un rendimiento del 96%.

- Aunque la invención ha sido descrita haciendo referencia en particular a realizaciones específicas, debe entenderse que la misma no está limitada a tales realizaciones, sino que debe ser considerada en su sentido más amplio y limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones que
15. siguen.

N O T A

- La patente de invención que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "MEJORAS EN UN METODO DE PRODUCCION DE PULULANO", con Prioridad de la Demanda de Patente en Japón nº 79413/1971 de fecha 11 de octubre de 1971, según las características esenciales de las siguientes:
- 20.

R E I V I N D I C A C I O N E S

25. 1ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, que consiste en un cultivo de un microorganismo productor de pululano bajo condiciones aeróbicas sobre un medio de cultivo que proporciona fuentes de carbono asimilable y nitrógeno así como nutrientes menores necesarios para el crecimiento
30. de dicho microorganismo hasta formar pululano en dicho medio,

m/c



y recuperar el pululano formado de dicho medio, caracterizadas porque en dicha fuente de carbono es un hidrolizado de almidón que tiene un equivalente de dextrosa de 20 a 70.

5. 2ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho equivalente de dextrosa es de 35 a 60.

10. 3ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho hidrolizado de almidón se prepara antes de dicho cultivo manteniendo el almidón bajo condiciones de hidrolización en presencia de agua y un agente hidrolizante seleccionado del grupo consistente en un ácido y una enzima hidrolizadora del almidón hasta alcanzar dicho equivalente de dextrosa.

15. 4ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, de acuerdo con la reivindicación 3ª, en el que dicho agente hidrolizante es ácido clorhídrico u oxálico.

20. 5ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, de acuerdo con la reivindicación 3ª, en el que dicho agente hidrolizante es la α -amilasa, isoamilasa, o malta-amilasa.

25. 6ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho microorganismo es la Pullularia fermentans var fermentans IFO 6401, Pullularia fermentans var fusca IFO 6402, Pullularia pullulans AHU 9553, Pullularia pullulans IFO 6353, o Dematiium pullulans IFO 4464.

7ª.- Mejoras en un método de producción de pululano, de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho hidrolizado consiste esencialmente en oligosacáridos.

30. 8ª.- Mejoras en un método de producción de pulula-

mE

407544



110

no, de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la concentración de dicho hidrolizado en dicho medio está comprendida entre el 5% y el 15% en peso.

5. 9ª.- MEJORAS EN UN METODO DE PRODUCCION DE PULULANO. NO.

Según queda sustancialmente descrito en la presente memoria, que consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 de octubre de 1972

10.

HAYASHIBARA BIOCHEMICAL LABORATORIES, INCORPORATED.

P. P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
P.P.

Firmado: M.ª Dolores Jerquera

15.

mf