

13  
438413

Inventor: COZG

-4 OCT. 1976

CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

Que por veinte años se solicita a favor de BAXTER  
LABORATORIES INC, de nacionalidad Estadounidense, con domi-  
cilio en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos), y que ha  
5 de recaer sobre: "METODO DE RECUPERACION SELECTIVA Y CUANTI-  
TATIVA DE ENZIMA LIPOLITICA DEL CUAJO DEL PRODUCTO DE LA FER-  
MENTACION DE ESPECIES MUCOR".

\*\*\*\*\*

Memoria Descriptiva

10 El registro de la Patente de Invención que se soli-  
cita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en  
todo el territorio nacional y sus posesiones de un método de  
recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica -  
del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor,  
15 conforme se describe a continuación.

Esta invención se relaciona con un método de recuperación de enzimas y más particularmente con un método de recuperación de una enzima lipolítica del producto de la fermentación de microorganismos Mucor.

5           Es sabido que los productos de la fermentación de microorganismos Mucor contienen enzimas lipolíticas en mezcla con otras enzimas, tales como carbohidrasas, proteasas y similares, como se describe en la patente estadounidense número 1.391.219.

10           Recientemente, se ha descrito la recuperación de valiosas y comercialmente importantes enzimas coagulantes de la leche, a partir de especies Mucor. Especies típicas de las que se han obtenido tales enzimas, a las que comúnmente se llama cuajo microbiano, son la Mucor pusillus, tal como se describe  
15           en las patentes estadounidenses Nos. 3.151.039 y 3.212.905, y la Mucor miehei, tal como se expone en las patentes de igual nacionalidad Nos. 3.549.390 y 3.763.011. En la patente de esta misma nacionalidad nº 3.616.233, las enzimas lipolíticas indeseadas que se producen conjuntamente con la enzima de cuajo  
20           en las especies Mucor son separadas del cuajo deseado mediante inactivación o destrucción por ajuste a un pH de 2,0 a 3,5 a una temperatura de 20 a 55°C. De acuerdo con la Memoria publicada alemana nº 2.232.996, las impurezas de lipasas se separan del cuajo deseado mediante ajuste a un pH de 4 a 6, seguido de filtración.  
25

          En la solicitud estadounidense número 458.737, depositada el 2 de mayo de 1974, propiedad de un concesionario común (e incorporada aquí como referencia), se describe la producción de un sistema aromatizante de enzimas lipolíticas a partir del Mucor miehei, que posee la deseable propiedad de -  
30

expresar una mayor actividad de las enzimas lipolíticas de esterases que de las enzimas lipolíticas de lipasa. Es decir, muestra una relación CA/LA superior a uno. Así, un método práctico de recuperación de enzimas lipolíticas dotada de dichas propiedades del sistema aromatizante sería de notable valor para las industrias alimentarias. En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar tal método de recuperación.

Expuesta brevemente, la presente invención comprende de la recuperación de una enzima lipolítica útil a partir del producto de la fermentación de especies Mucar, mediante tratamiento del referido producto con adsorbentes de tierra de diatomeas y arcillas a un pH relativamente bajo, seguido de elución del material adsorbido a un pH relativamente elevado.

Se ha observado, sorprendente e inesperadamente, que, de acuerdo con el método de la presente invención, se consigue una recuperación selectiva de la deseada enzima lipolítica a partir de la enzima del cuajo, con rendimientos casi cuantitativos. El rendimiento del cuajo es también excelente, permitiendo así su retención para emplearse como enzima coagulante de la leche cuando se desee, de acuerdo con la práctica anterior.

La gama preferida de pH para la adsorción de la enzima lipolítica es de 4 a 6 aproximadamente, en tanto que el nivel de pH preferido para la elución de la enzima lipolítica es de 9 a 11 aproximadamente.

Las tierras diatomáceas preferidas son los auxiliares filtrantes "Celite", comercialmente obtenibles de Johnmenville, y más preferiblemente el "Filter-Col". Este último material es la más fina diatomita de grado Celite, con un aná

lisis de cribado del 1% retenido en 150 mallas. Es una diatomita natural que ha sido selectivamente extraída de la cantera, secada, molida y clasificada por aire. Su análisis químico se indica como sigue:

	<u>Componente</u>	<u>%</u>
5	SiO <sub>2</sub>	85.8
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3.8
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.2
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.2
10	TiO <sub>2</sub>	0.2
	CaO	0.5
	MgO	0.6
	Na <sub>2</sub> O	1.1
15	K <sub>2</sub> O	1.1

Los materiales arcillosos que pueden emplearse de acuerdo con la invención son las montmorillonitas y los silicatos aluminicos hidratados, tales como la bentonita y el caolin. La arcilla preferida es la "Volclay", que es una bentonita occidental comercialmente obtenible en Whittaker, Clark & Daniels, Inc.

Los citados materiales adsorbentes se usan en concentraciones comprendidas entre el 0,5 % y el 15 % aproximadamente, y mejor aún entre el 1,0 % y el 5 % aproximadamente, en peso. Unas concentraciones superiores al 15 % son innecesarias.

La operación de adsorción puede llevarse a cabo ajustando el producto de la fermentación de especies *Mucor* a un pH relativamente bajo y mezclando íntimamente con la tierra diatomácea o material arcilloso a temperatura ambiente. El material

adsorbido se separa luego del material enzimático no adsorbido del cuajo, tal como por filtración o centrifugación. La daseada enzima lipolítica puede someterse luego a elución del material adsorbente separado, mediante ajuste a un pH relativamente elevado o íntimo, mezclado a temperatura ambiente.

5

En la mayoría de los casos, un mezclado, tal como por agitación durante unas 15 minutos a 2 horas aproximadamente, resulta adecuado para conseguir la adsorción y elución de daseada. Un mezclado a temperaturas ambientales normales, tales como de 20 a 25°C aproximadamente, es adecuado y no es necesario reducir ni aumentar la temperatura ambiente durante las operaciones de mezclado.

10

La producción de la enzima lipolítica que se recupera de acuerdo con el método de esta invención puede llevarse a cabo mediante procedimientos de fermentación clásicos. Así, un medio nutriente que contenga carbono asimilable, nitrógeno y poquénimas cantidades de minerales, se incuba con un cultivo de una especie de Mucor, especialmente la Mucor nichel, y se fermenta bajo condiciones aeróbicas, sumergido, a un pH de 3 a 8 aproximadamente y a una temperatura de 20 a 50°C aproximadamente, durante un tiempo aproximado de 2 a 14 días. Ejemplos de razas de Mucor nichel que puedan fermentarse de dicho modo para producir la daseada enzima lipolítica, pueden obtenerse por el público sin restricción alguna bajo las designaciones cifradas de NRRL A 13,131 y A 13,042 en los Northern Regional Research Laboratories, de Peoria, Illinois, EE.UU. - Otras razas adecuadas de Mucor nichel y otras especies Mucor, por ejemplo las especies pusillus, hiemalis, rouxii, anneven- sia, lamprosporus y racemosus, resultarán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la presente descrip

15

20

25

30

ción.

Después de la fermentación, la enzima lipolítica puede recuperarse directamente de la masa, de esta masa filtrada o de un concentrado del licor del producto. Así, la ci  
5 ta masa o pasta pulposa puede usarse directamente o bien puede filtrarse para separar el micelio y otras materias sólidas remanentes de la fermentación o bien el licor del producto desarrollado puede concentrarse, tal como por evaporación, para reducir el volumen de material a manipular por el  
10 procedimiento de recuperación de esta invención.

Los siguientes ejemplos ilustrarán adicionalmente la invención, si bien se entenderá que ésta no se limita a tales ejemplos.

Ejemplo 1

15

Se desarrolla Mucor michei, NRRL 13,042, bajo condiciones de fermentación aeróbica a 37°C y a un pH 6, en un tanque de producción que contiene el siguiente medio nutritivo acuoso:

20	Harina de soja desgrasada Kaysoy	4,0
	Suero dulce secado por pulverización	4,0
	Fécula de maíz licuada con alfa-amilasa bacteriana	16,0
	Agua	<u>76,0</u>
25		100,0%

25

El caldo de fermentación se recoge después de 77 horas de fermentación y seguidamente se recupera la deseada enzi  
ma lipolítica de la forma siguiente. Se filtra el caldo de fer  
mentación y se evapora hasta una concentración de 24° Baumé.  
30 El material evaporado filtrado se ajusta luego a 3,0° Baumé

con agua y se ajusta el pH a 5,0 con NaOH 2N. Luego se añade Volclay KVK (bentonita) e 125 gramos del material evaporado diluido hasta una concentración del 2,5 % en peso. Se agita la mezcla durante 1 hora a 25°C y seguidamente se filtra en presencia de un 2,0% en peso de auxiliar filtrante Hyflo Super-Cal (diatomita con un análisis de cribado del 5% retenido en 150 mallas). Se ajusta el pH del filtrado a un valor de 4,0 con ClH 2N, se evapora hasta 14,2 gramos y se ensaya para determinar el cuajo y la enzima lipolítica. Los ensayos muestran la recuperación de un 72,7 % de cuajo y de un 0% de enzima lipolítica. La parte del filtro que queda después de la anterior operación de filtrado (12,6 gramos) se suspende en 100 ml de agua y se ajusta el pH a 10,0 con NaOH 1N. Se agita la mezcla durante 1 hora a una temperatura de 23 a 25°C. Seguidamente se añade auxiliar filtrante Speedex (diatomita) hasta una concentración del 3% y se filtra la mezcla. Luego se ajusta el pH a 4,0 con ClH 2N, se evapora hasta una concentración aproximadamente 6 veces mayor y a continuación se ensaya para determinar la enzima lipolítica. El ensayo muestra una recuperación del 127% de tal enzima.

### Ejemplo 2

Se repite el procedimiento de recuperación del Ejemplo 1, con la excepción de que el material inicial se diluye a 5,0% Baumé y se emplea tierra diatomácea filter-Cal en lugar del Volclay. En una operación, usando un 2,5% en peso de Filter-Cal, se recupera un 251% de la actividad de la enzima lipolítica, y en otra operación, usando un 5,0% en peso de Filter-Cal, se recupera un 151% de la actividad de dicha enzima.

Los ensayos de esta enzima expuestos en los Ejemplos

1 y 2 son sobre la base de los ensayos enzimáticos de los materiales evaporados y filtrados iniciales. Los ensayos enzimáticos se efectúan de acuerdo con procedimientos expuestos en la solicitud estadounidense número 458.737, depositada el 2 de mayo de 1974 y muestran relaciones EA/LA superiores a uno. Estos ensayos muestran que por el procedimiento de ensayo empleado se detecta más enzima lipolítica en el producto recuperado que en el material inicial.

### Ejemplo 3

Se repiten los Ejemplos 1 y 2, con la excepción de que las fermentaciones se llevan a cabo con un medio nutritivo acuoso que contiene un 12% de fécula de maíz enzimáticamente degradada, un 1,5% de harina de soja (Nutrisoy 300 C) y un 3% de suero seco y el caldo de fermentación se recoge después de 114 horas de fermentación. Siguiendo los procedimientos de recuperación de los Ejemplos 1 y 2, se consigue una recuperación selectiva y cuantitativa sustancialmente similar de enzima lipolítica.

### Ejemplo 4

El producto resultante de otra fermentación de Bucar mishi en tanque de producción, bajo condiciones aeróbicas y en adecuados medios nutrientes, se diluye con un volumen igual de agua y se ajusta el pH a 5,0 con ClH N. Se trata una porción de la masa diluida (300 gramos) con (a) un 5% en peso de Volcley y (b) una porción similar con un 5% en peso de Filter-Col como en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente. En cada caso, (a) y (b), se añade un 2% en peso de auxiliet filtrante Hyflo Super-Col, se filtra el material y se rocía luego con agua. Cada

5 pasta de filtró se divide en tres partes iguales y se absorben en 100 ml de agua por cada 25 gramos de pasta. Se ajusta el pH de las tres partes de 10,0, 10,5 y 11,0, respectivamente, con NaOH 2N y, después de agitarse durante una hora a 25°C, se filtra el material y se rocía con agua. El filtrado y el rociado combinados se ajustan a un pH de 5,2 a 5,5 con ClH N y se ensayan.

10 El cuajo y la enzima lipolítica en la masa diluida original, en los filtrados de Volclay y Filter-Cel y en las pastas eluidas de Volclay y Filter-Cel se exponen seguidamente:

	<u>Sustrato de ensayo</u>	<u>% rendimiento cuajo</u>	<u>% rendimiento enzima lipolítica</u>
	Masa 1:1 diluida	100	100
15	(a) 5% filtrado Volclay	54,4	10
	(b) 5% filtrado Filter-Cel	65,0	11,2
	(a)		
	Pasta de Volclay eluida a un pH 10,0		127
20	Pasta de Volclay eluida a un pH 10,5		118
	Pasta de Volclay eluida a un pH 11,0		22,5
	(b)		
	Pasta Filter-Cel eluida a un pH 10,0		62,2
25	Pasta Filter-Cel eluida a un pH 10,5		121,0
	Pasta Filter-Cel eluida a un pH 11,0		36,7

30 Para los expertos en la materia resultarán evidentes otros diversos ejemplos, así como modificaciones de los anteriores ejemplos, tras la lectura de la anterior descripción, sin

apartarse del espíritu y ámbito de la invención. Todos esos ejemplos y modificaciones deberán considerarse incluidos en el ámbito de las adjuntas reivindicaciones.

Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser tomados siempre en sentido amplio, no limitativo.

#### NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de BAXTER LABORATORIES INC, con domicilio en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

1.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies *Mucor*, caracterizado en que comprende la adsorción del citado producto de fermentación con material seleccionado entre el grupo consistente en tierra de diatomeas y arcilla a un pH de 4 a 6 aproximadamente y la ulterior elución de la enzima lipolítica a partir del adsorbente mediante ajuste del pH a un valor de 9 a 11 aproximadamente.

2.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies *mucor*, según la reivindicación 1, caracterizado en que la especie *Mucor* es *Mucor miehei*.

3.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies *mucor*, según la reivindicación 2, caracterizado en que el *Mucor miehei* es de la raza designada por NRRL A 13,042.

4.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa

de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 1, caracterizado en que el adsorbente es una tierra de diatomeas.

5

5.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 1, caracterizado en que la arcilla adsorbente es bentonita o caolín.

10

6.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 1, caracterizado en que la concentración de adsorbente es del 0,5 % al 15 % aproximadamente por peso del producto de la fermentación.

15

7.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 6, caracterizado en que la concentración de adsorbente es del 1 % al 5 % aproximadamente.

20

8.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 1, caracterizado en que el pH de la adsorción es de 5 aproximadamente.

25

9.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 1, caracterizado en que el pH de la elución es de 10 o 11 aproximadamente.

30

10.- Método de recuperación selectiva y cuantitativa de enzima lipolítica del cuajo del producto de la fermentación de especies mucor, según la reivindicación 4, caracterizado en que la tierra de diatomeas es Filter-Cal.

11.- MÉTODO DE RECUPERACION SELECTIVA Y CUANTITATI-

VA DE ENZIMA LIPOLITICA DEL CUAJO DEL PRODUCTO DE LA FERMENTACION DE ESPECIES MUCOR".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de doce hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

5

Madrid, 10 de Junio de 1975

P. A. de BAXTER LABORATORIES INC.

Victor Gil Vega,

