

- 2 ENE. 1976

P.- 61.919

No. 19706 388.892
"GLUCOAMYLASE"

443222

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

Int. Cl.:	e 12D

PATENTE DE INVENCION

A nombre de CPC INTERNATIONAL INC.

entidad norteamericana

establecida en International Plaza, Englewood Cliffs,

Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE GLUCOAMILASA"

15.12.75

- 1 -

Esta invención se refiere a la producción de glucoamilasa. Se refiere también al aumento de rendimiento durante el proceso de fermentación en la producción de glucoamilasa.

5 La glucoamilasa es una enzima capaz de convertir el almidón en dextrosa. El uso de glucoamilasa para producir dextrosa y jarabes que contienen dextrosa es muy conocido en la técnica. Los procedimientos en los que
10 se usa glucoamilasa están divididos generalmente en tres clases. Estos son el procedimiento de conversión de ácido-licuefacción-enzima, el procedimiento de conversión de enzima-licuefacción-enzima, y el procedimiento de conversión de enzima-solubilización-enzima (el procedimiento de hidrólisis de almidón granular tal como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 3.922.197, 3.922.198, 3.922.199 y 3.922.200).

15 En el procedimiento de ácido-enzima, el almidón se licúa y se hidroliza en una suspensión acuosa que
20 contiene de 20 a 40 por ciento de almidón y un ácido, tal como ácido clorhídrico. La suspensión se calienta después a una temperatura alta, es decir una temperatura entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 160°C, y a un pH entre aproximadamente 1 y 4,5, para licuar e hidrolizar parcialmente el almidón. El almidón licuado y parcial

25
15.12.75

mente solubilizado tendrá en general un índice de equivalente de dextrosa (E.D.) de hasta aproximadamente 20, y preferiblemente de hasta aproximadamente 15. Se describen procedimientos típicos de ácido-enzima en las patentes de los EE.UU. Nos. 2.305.168, 2.531.999, 2.893.921, 3.042.584 y 3.012.944.

En el procedimiento enzima-enzima, el almidón se licúa y se hidroliza en una suspensión acuosa que contiene 20 a 40 por ciento de almidón y una enzima licuadora, tal como enzima alfa-amilasa bacteriana, a una temperatura de desde aproximadamente 85°C a aproximadamente 105°C. El índice de equivalente de dextrosa del almidón licuado y parcialmente hidrolizado es generalmente menor de aproximadamente 20, y preferiblemente menor de aproximadamente 15. Un procedimiento revolucionario para preparar un producto de hidrólisis parcial adecuado para convertir almidón en dextrosa y jarabes que contienen dextrosa, comprende licuar almidón en agua con una preparación de enzima alfa-amilasa bacteriana, hasta un índice equivalente de dextrosa de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, tratar por calor la suspensión que contiene el almidón licuado, hasta una temperatura mayor de unos 95°C, y después convertir el almidón licuado, con una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana hasta un E.D. de hasta aproximadamente 20. Este procedimiento revolu-

15.12.75

cionario se describe y reivindica en la patente de los EE.UU. nº 3.853.706.

5 En el procedimiento de almidón granular de enzima-enzima, una suspensión de almidón granular se solubiliza por acción de alfa-amilasa bacteriana (preferiblemente una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana derivada del microorganismo Bacillus licheniformis) en condiciones tales que el almidón no se gelatiniza ni disminuye su viscosidad. El almidón solubilizado puede
10 convertirse después en dextrosa o jarabes que contienen dextrosa por medio de otras enzimas, tales como la glucoamilasa.

15 Los productos de almidón parcialmente hidrolizados o solubilizados preparados por cualquiera de los tres procedimientos citados antes, pueden tratarse después con preparaciones de enzima glucoamilasa, para convertir el producto de hidrólisis del almidón en dextrosa o jarabes que contienen dextrosa.

20 Los productos de hidrólisis convertidos enzimáticamente se someten después a procedimientos conocidos de refinado con carbono y por cambio de iones para eliminar las sustancias colorantes, los materiales odoríferos, y los constituyentes que contribuyen al contenido de ceniza de los productos de hidrólisis. Estos tratamientos conocidos implican el tratamiento del jarabe con carbón acti-
25

vo a un pH ácido (es decir a un pH de aproximadamente 4 a 6, pues el carbón activado por el pH es el más efectivo) y tratar después el jarabe tratado con carbón con una resina de cambio de cationes de ácido fuerte en forma de hidrógeno, y una resina cambiadora de aniones de base débil en forma de base libre.

La glucoamilasa es conocida en la técnica con muchos nombres, tales como glucamilasa, enzima glucógena, etc.

La glucoamilasa la producen muchos tipos de microorganismos. Ciertas cepas de hongos que pertenecen al género Aspergillus, tales como las cepas conocidas como Aspergillus niger, y ciertas cepas de los géneros Rhizopus y Endomyces, producen glucoamilasa. Los microorganismos anteriores producen también enzimas tales como la alfa-amilasa y la transglucosidasa. Las enzimas transglucosidasas son capaces de producir polímeros de sacáridos que son infermentables. Así pues, la presencia de transglucosidasa en preparaciones de enzima de glucoamilasa se considera generalmente indeseable.

Hay muchos métodos conocidos en la técnica para preparar glucoamilasa. Muchos métodos tratan de la eliminación de transglucosidasa presente en preparaciones de enzima de glucoamilasa, por ej. los métodos descritos en las patentes de los EE.UU. nos. 2.976.804, 3.042.584,

3.075.886, 3.117.063, y 3.254.003. Se describe un progreso importante en la técnica de preparación de glucoamilasa en la patente de los EE.UU. Nº 3.012.944, en la que se describe y reivindica un procedimiento de mutación de un microorganismo capaz de producir glucoamilasa. Con este método se obtienen rendimientos superiores de glucoamilasa y cantidades menores de transglucosidasa.

5

La producción comercial de glucoamilasa se efectúa en varias operaciones, comenzando con una etapa de propagación iniciada inoculando esporas de un caldo de un cultivo en un medio nutriente pre-esterilizado contenido usualmente en un matraz agitador. El crecimiento se mejora aireando el medio nutriente y manteniendo el pH y la temperatura adecuados en su interior. Las etapas iniciales se denominan etapas de desarrollo del cultivo. Los microorganismos de la última etapa de desarrollo del cultivo (la etapa de siembra) se inoculan en un fermentador en gran escala para producir cantidades comerciales de glucoamilasa.

10

15

20

El medio nutriente, al menos en la etapa final del desarrollo, contiene, como sustancias nutrientes primarias, una fuente de carbono en forma de un carbohidrato y una fuente de nitrógeno, tales como nitratos o materiales proteínicos. Como fuente de carbono, el medio nutriente contiene generalmente maíz molido en cantidades

25

15.12.75

que van hasta aproximadamente 10 por ciento en peso, y cantidades variables de almidón. Antes de la inoculación del medio nutriente con el microorganismo productor de glucoamilasa, el medio nutriente se esteriliza calentándolo a una temperatura de al menos aproximadamente 120°C, y manteniendo el medio a esta temperatura durante varios minutos. El calentamiento del medio nutriente licúa el maíz molido. Sin embargo, si el contenido de sólidos del maíz molido es de más del 10%, hay un aumento de viscosidad tal que los agitadores del fermentador no pueden funcionar normalmente. El calentamiento del medio nutriente hasta la temperatura de esterilización sin ayuda de un catalizador hidrolítico, tal como una enzima licuadora, da como resultado un fenómeno denominado en la técnica "golpe de vapor". Así pues, en los procedimientos comerciales para producir glucoamilasa se emplea una enzima de alfa-amilasa en el medio nutriente, antes de la esterilización, para ayudar a la licuefacción del maíz molido y aliviar el problema del "golpe de vapor".

Aunque la adición de alfa-amilasa durante el proceso de esterilización ayuda a la licuefacción del maíz molido, el uso de más de 10% en peso de maíz molido es poco práctico en general, por el aumento de viscosidad.

La presente invención proporciona un procedimiento por el que se fabrica glucoamilasa en un medio nu-

15.12.75

tricio que contiene más de aproximadamente 16%, y hasta aproximadamente 25% en peso, medido en sustancia seca, de un maíz molido licuado enzimáticamente. El uso de mayores concentraciones de maíz molido licuado en el medio nutriente aumenta la producción de glucoamilasa en el medio de fermentación.

La invención proporciona también un procedimiento por el que el medio nutriente para preparar glucoamilasa, que contiene maíz molido, se trata con una alfa-amilasa bacteriana derivada del *Bacillus licheniformis* antes de la esterilización, con lo que el proceso de esterilización licúa el maíz molido en presencia de dicha enzima. Esta realización de la invención aporta una reducción de la viscosidad en el caldo, disminuye la demanda energética de los agitadores de los fermentadores, permite el uso de mayores niveles de maíz molido (que produce mayores proporciones de glucoamilasa) y reduce el tiempo necesario para alcanzar la temperatura de esterilización, requiriendo por ello menos atención, y reduciendo la degradación de los constituyentes del medio nutricio.

El procedimiento de la presente invención comprende fermentar un microorganismo capaz de producir glucoamilasa en un medio nutriente que contiene una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono, en el que dicha fuente de carbono comprende un maíz molido licuado enzimática-

15.12.75

mente, que tiene un contenido de sólidos mayor de aproximadamente 16%, y hasta aproximadamente 25%, en base a sustancia seca.

5 Como otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento de preparación de glucoamilasa, que comprende: fermentar un microorganismo capaz de producir glucoamilasa en un medio nutriente que contiene una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono, en el que la fuente de carbono comprende maíz molido que se
10 ha licuado por acción de calor, agua y una preparación de enzima alfa-amilasa derivada del microorganismo Bacillus licheniformis.

El procedimiento de la invención aporta muchas ventajas económicas, incluyendo mayores rendimientos en
15 la producción de glucoamilasa.

Una de las ventajas más importantes del procedimiento de la presente invención es que puede efectuarse en un medio acuoso a concentraciones relativamente altas. El contenido de sólidos de este almidón molido está generalmente en el intervalo de aproximadamente 16%
20 a aproximadamente 25%, aunque ordinariamente el contenido de sólidos está en el intervalo de desde aproximadamente 18% a aproximadamente 22%. Pueden usarse concentraciones menores, y, en general, a medida que disminuye la concentración disminuye también el rendimiento de glucoami-
25

lasa.

El modo preferido de efectuar el procedimiento de la invención es preparar primero un medio de cultivo adecuado para producir la preparación de enzima de glu
5 coamilasa. El medio de cultivo se prepara mezclando maíz molido como fuente primaria de carbono, sólidos de licor de maceración de maíz como fuente primaria de nitrógeno, una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana, preferiblemente derivada del Bacillus licheniformis, agua
10 y otros nutrientes, tales como almidón y sales de amonio. Esta mezcla se efectúa generalmente a temperaturas comprendidas entre 20°C y aproximadamente 60°C. La mezcla se calienta después gradualmente, por acción de vapor de agua, hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 110°C hasta aproximadamente 130°C, y preferiblemente
15 en el intervalo de desde aproximadamente 120°C hasta aproximadamente 125°C. La alfa-amilasa bacteriana puede añadirse antes del calentamiento del medio nutriente con vapor, o durante el mismo. Sin embargo, se prefiere
20 añadir la enzima durante el calentamiento del medio nutriente.

El pH del medio nutriente durante la esterilización se ajusta para una máxima eficiencia de la preparación de enzima de alfa-amilasa. El pH está generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 4,5 a 7,5,

y preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 6,5, y más preferiblemente de aproximadamente 5,5 a 6,0.

5 Un modo preferido de efectuar la esterilización es calentar gradualmente el medio nutriente que contiene maíz molido, sólidos de licor de maceración de maíz, agua, y alfa-amilasa bacteriana hasta una temperatura en el intervalo de desde aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C, y preferiblemente en el intervalo de desde 10 aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C, y a un pH en el intervalo de desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Preferiblemente, el medio nutriente se mantiene a esta temperatura durante un breve período, es decir de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 60 15 minutos, y preferiblemente de 30 minutos a unos 45 minutos, para licuar o diluir sustancialmente el maíz molido en el medio. Después, el medio nutriente se calienta más por acción de vapor de agua hasta una temperatura de al menos unos 110°C, y preferiblemente una temperatura de 20 al menos 120°C, y se mantiene a esta temperatura elevada durante un período de al menos 30 minutos, y preferiblemente al menos unos 45 minutos. El medio nutriente esterilizado se enfría después y el pH se ajusta a aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0.

25

En el medio nutriente esterilizado se inocu-

15.12.75

la después el microorganismo productor de glucoamilasa. Se deja que tenga lugar la fermentación durante 48 a 168 horas.

5 El uso de cantidades superiores de maíz molido diluido en el medio de fermentación, que se facilita por el uso de las preparaciones de enzima alfa-amilasa bacteriana derivada del Bacillus licheniformis, permite obtener más de 30 unidades de glucoamilasa por ml.

10 El microorganismo productor de glucoamilasa puede derivarse de cualquiera de las preparaciones de amilasa fúngica bien conocidas, particularmente las derivadas de miembros del género Aspergillus, género Frdomyces y género Rhizopus. Una glucoamilasa particularmente preferida es la obtenible por el procedimiento descrito en la patente de los EE.UU. nº 3.042.584, en el que una preparación de amilasa fúngica se libera de la actividad no deseada de transglucosidasa por tratamiento, en un medio acuoso, con un mineral de arcilla. Las unidades de actividad de glucoamilasa se determinan como sigue:

15 20 El sustrato es un producto de hidrólisis, de 15-18 de E.D., de almidón de maíz disuelto en agua y diluido a 4,0 gramos de sustancia seca por 100 ml de disolución. Con una pipeta, se llevan exactamente 50 ml de la disolución a un matraz volumétrico de 100 ml. Se añaden al matraz 5,0 ml de tampón 1,0 molar de acetato de

sodio-ácido acético (pH 4,3). El matraz se coloca en un baño de agua a 60°C y al cabo de 10 minutos se añade la cantidad adecuada de preparación de enzima. Exactamente 120 minutos después de la adición de la preparación de enzima, se ajusta la disolución a un punto final de fenolf taleína con hidróxido de sodio uno normal. La disolución se enfría después hasta la temperatura ambiente, y se diluye al volumen deseado. Se determina, sobre la muestra diluida y sobre un control que no tiene preparación de enzima, un índice de azúcar reductor, calculado como dextrosa. La actividad de glucoamilasa se calcula como sigue:

$$A = \frac{S - B}{2 \times E}$$

donde

A = unidades de actividad de glucoamilasa por ml. (o por gramo) de preparación de enzima.

B = azúcares reductores en el control, gramos por 100 ml.

S = azúcares reductores en la muestra convertida por la enzima, gramos por 100 ml.

E = cantidad de preparación de enzima usada, ml (o gramos).

S no ha de exceder de 1,0 gramo por 100 ml.

25

La alfa-amilasa bacteriana usada para dismi-

15.12.75

5

nuir la viscosidad del maíz molido es preferiblemente una activa a un pH relativamente bajo, es decir en el intervalo de desde aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, y también a temperaturas relativamente elevadas, es decir de hasta aproximadamente 105°C. Las fuentes preferidas de estas alfa-amilasas incluyen ciertas especies del microorganismo Bacillus, tal como el Bacillus licheniformis. Se describen alfa-amilasas adecuadas en la Patente Británica nº 1.296.839 y en la patente de los EE.UU. nº 3.697.378.

10

Son amilasas especialmente adecuadas las derivadas del B. licheniformis descritas en la patente Británica anterior. Se prefiere particularmente la alfa-amilasa derivada de la cepa NCTB 8061 del Bacillus licheniformis ;

15

otros microorganismos específicos comprenden el B. licheniformis, cepas NCTB 8059, ATCC 6598, ATCC 6634, ATCC 8480, ATCC 9945A y ATCC 11945. Son desusadamente efectivas en la licuefacción del maíz molido. Una de ellas se identifica por la marca de fábrica de "THERMANYL", obtenible del Novo Terapeutisk Laboratorium, Copenhague, Dinamarca.

20

Para esta aplicación ha de usarse en una concentración comprendida entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 25 unidades por gramo de maíz molido (sustancia seca) en las condiciones de pH y temperatura descritas anteriormente. La THERMANYL se caracteriza por las propiedades siguientes:

25

15.12.75

- (a) es térmicamente estable
- (b) tiene un amplio intervalo de actividad de pH, y
- (c) su actividad y estabilidad térmica son independientes de la presencia de ión calcio añadido.

5

Su análisis es el siguiente:

Sustancia seca, %	94,6	94,6
Actividad de alfa-amilasa, U/g (tal como está)		9.124
Proteína % con base en sustancia seca		21,2
Ceniza, % con base en sust. seca		64,1
Calcio, % con base en sust. seca		4,5

10

Otras alfa-amilasas adecuadas incluyen el

15

THERMAMYL 60 (líquido), y el THERMAMYL 120 (sólido) que tienen los análisis siguientes:

	<u>THERMAMYL 60</u>	<u>THERMAMYL 12</u>
Sustancia seca, %	35,4	98,8
Actividad de alfa-amilasa, U/g (tal cual es)	1.156	2.105
Proteína, % con base en sust. seca	26,5	21,2
Ceniza, % con base en sust. seca	60,1	91,2
Calcio, % con base en sust. seca	0,04	0,72
Sodio, % con base en sust. seca	12,3	12,2

25

15.12.75

La actividad de alfa-amilasa de una enzima se determina como sigue:

5 Se deja reaccionar la enzima con una disolución patron de almidón en condiciones controladas. La actividad de la enzima se determina por el grado de hidrólisis del almidón, reflejada por el descenso en la capacidad de tinción con yodo, que se mide espectrofotométricamente. La unidad de actividad de alfa-amilasa bacteriana es la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 10 mg de almidón por minuto, en las condiciones del procedimiento. El método es aplicable a las alfa-amilasas bacterianas, incluyendo las preparaciones industriales, excepto los materiales que tienen actividad sacarificante importante.

15 De 0,3 a 0,5 gramos de muestra sólida, o de 0,3 a 1,0 ml de una muestra líquida, se disuelven en una cantidad suficiente de cloruro de calcio acuoso 0,0025 M para dar una disolución de enzima que contiene aproximadamente 0,24 unidades de actividad por ml.

20 Se mezclan una mezcla de 10 ml de disolución de almidón Lintner al 1%, equilibrada a 60°C, y 1 ml de la muestra de enzima a ensayar, y se mantienen en un baño de temperatura constante a 60°C durante exactamente 10 minutos. Se elimina una muestra de 1 ml y se añade a una mezcla de 1 ml de ácido clorhídrico acuoso 1 N y

aproximadamente 50 ml de agua destilada. La capacidad de manchado con yodo de esta muestra acidificada se determina después añadiendo 3,0 ml de una disolución acuosa de yodo al 0,05%, diluyendo a 100 ml con agua destilada, y mezclando bien. Se mide la absorbancia de la disolución con respecto a la del agua destilada, a 620 nm, en una cubeta de 2 cm. Se hace una medida similar de la disolución patrón de almidón (a la que se añade agua, en lugar de la disolución de enzima) para disponer de una absorbancia de una muestra en blanco.

La actividad de la enzima, en unidades/gramo o /ml. es igual a

$$\frac{(\text{Absorbancia en blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}) \times \text{Factor de dilución} \times 50}{\text{Absorbancia en blanco} \times 10 \times 10}$$

Absorbancia en blanco x 10 x 10

Las expresiones "E.D" e índice de equivalente de dextrosa usadas aquí se refieren al contenido de azúcares reductores de los sólidos disueltos en un producto de hidrólisis de almidón, expresado como tanto por ciento de dextrosa, medido por el método de Schoorl (Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis, Vol. 11, pags 41-42).

La invención se ilustra además por medio de los ejemplos siguientes, que, no obstante, no han de con-

15.12.75

siderarse limitativos en ningún aspecto. Todas las partes y los tantos por ciento son en peso, a no ser que se indique otra cosa.

5

Ejemplo 1

(a) Desarrollo del cultivo y de la siembra

Se empleó el siguiente procedimiento para preparar el agente inoculante para producir glucoamilasa.

10

Un racimo de esporas de una variante esporulada de una cepa mutante de *Aspergillus niger* (como en la patente de los EE.UU. nº 3.012.944 concedida a Armbruster) se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1 litro que contenía 200 ml. de medio estéril de la composición siguiente:

15

Sólidos de licor de maceración de maíz	2,0% con base en sust. seca
Maíz maduro molido	5,0% con base en sust. seca
Hidróxido de sodio, hasta pH	6,0 - 6,5

20

El matraz inoculado se incubó durante 48 horas a 30°C a 35°C en un agitador giratorio. El contenido del matraz se llevó después a un fermentador de 7,5 litros que contenía 4 litros del mismo medio de siembra previamente esterilizado (esterilizado 1,5 horas a 121°C, pH 6,0). El fermentador de siembra de 7,5 litros se hi-

25

15.12.75

zo girar, con agitación, a 500 revoluciones por minuto, con inyección de aire a 3 litros por minuto y a una temperatura de 33°C, durante 24 horas. El agente de inoculación así producido se usó en fermentadores de 40 litros para la producción de glucoamilasa.

5

(b) Producción de medio nutriente esterilizado

El medio nutriente esterilizado que hay que emplear para la producción de glucoamilasa de este ejemplo se produjo en varios lotes por separado, cada uno en un fermentador de 40 litros que tenía agitadores de seis paletas de 11,4 cm. de diámetro y una anchura de 2,2 cm, y una fuente de aire estéril de 24 litros por minuto. Los fermentadores se hicieron trabajar a 600 revoluciones por minuto, a una presión en el recipiente de 1 kg/cm² manométrico y a una temperatura de aproximadamente 33°C. Cada uno de los fermentadores se cargó con 29 litros de medio de fermentación que tenía la composición siguiente:

10

15

20

Maíz nº 2 molido	15,9% con base en sust. seca,
(Fermentadores 1, 2 y 3)	4770 g con base en sustancia seca, 5450 g tal cual es

Maíz nº 2 molido	20,0% con base en sust. seca,
(Fermentador nº 4)	6000 g de sust. seca, 6900 g. tal cual es

25

15.12.75

Sólidos de licor de maceración de maíz 2,5% con base en sust. seca,
750 g con base en sust. seca,
150 g tal cual es .

5 Hidróxido de sodio,
hasta pH 6,0 - 6,5
(antes de la esterilización)

10 Se añadió alfa-amilasa (Thermamyl 60) al medio de fermentación a cada uno de tres fermentadoras, a concentraciones de 1,6, 2,8 y 4,0 unidades de alfa-amilasa CPC por gramo de maíz molido, respectivamente, con base en sust. seca. Se añadió alfa-amilasa CPR-8 al cuarto fermentador, en la proporción de 1,6 unidades por gramo de maíz molido, con base en sust. seca. La enzima se
15 añadió durante el calentamiento (con vapor de agua) de los fermentadores, al pasar las temperaturas de 60°C. La temperatura se mantuvo a 75°C durante 30 minutos, y después se dejó que se elevara a 121°C durante un período
20 de esterilización de 45 minutos. Después de la esterilización, el volumen en los fermentadores era de 30 litros.

25 Las diferentes preparaciones de enzima de alfa-amilasa bacteriana usadas para licuar el maíz molido en los fermentadores durante la licuefacción y esterilización del medio nutriente, fueron Thermamyl 60 líqui-

15.12.75

do, que tenía una potencia de 1270 unidades de alfa-ami-
lasa CPC/ml. (una preparación de enzima de alfa-amilasa
bacteriana derivada del Bacillus licheniformis), y CPR-8,
una preparación seca sobre un soporte de calcio, que te-
5 nía una potencia de 3200 unidades de alfa-amilasa CPC/gra-
mo (Fabrica y vende la CPR-8 la División Wallerstein de
la Baxter Laboratories, Inc.).

Se hicieron medidas de viscosidad de los me-
dios nutricios antes descritos, después de la reducción
10 de viscosidad y la esterilización, para averiguar las ven-
tajas del uso de enzimas derivadas del Bacillus licheni-
formis. La reducción de viscosidad y la esterilización
se efectuaron en el fermentador de 40 litros antes descri-
to. El medio nutriente (que contenía 15,9% de maíz moli-
15 do, medido en sustancia seca) se calentó con vapor de agua
a 75°C a un pH de 6,0. La alfa-amilasa se añadió cuando
la temperatura pasó de 60°C. La temperatura se mantuvo
a 75°C durante 30 minutos, y después se efectuó la este-
rilización durante 45 minutos a 121°C. Las medidas de vis-
20 cosidad de los medios nutrientes resultantes se exponen
en la Tabla I.

TABLA I

Efecto de la reducción enzimática de viscosidad en la viscosidad después de la esterilización.

Alfa-amilasa (unidades/g. de maíz, con base en sust. seca)

5	<u>Thermamyl 60</u>			<u>CPR-8</u>
	<u>1,6</u>	<u>2,8</u>	<u>4,0</u>	<u>1,6</u>
Viscosidad Brookfield,				
c.p. medida a 33°C				
	155	170	155	3600

10 Los datos anteriores demuestran claramente la mayor licuefacción y reducción de viscosidad obtenidas usando una alfa-amilasa derivada del Bacillus licheniformis. Esta ventaja, única, (menor viscosidad en el medio de fermentación) permite una mejor transferencia de calor (facilita la esterilización), reduce el consumo de energía de los agitadores, y reduce el "golpe de vapor" debido a la inyección de vapor de agua en el medio de maíz molido durante el calentamiento al ir licuándose el almidón (el calentamiento fué regular y continuo usando

15 Thermamyl, mientras que los fermentadores se bamboleaban durante el calentamiento con CPR-8). La licuefacción más efectiva usando Thermamyl permite calentamientos más rápidos hasta la temperatura de esterilización, y enfriamientos más rápidos, lo que significa que el ciclo de esterilización puede acortarse, aumentando así la producti-

20

25

vidad del fermentador.

En otra serie de experimentos en el fermentador de 40 litros que contenía 15,9% de maíz molido, con base en sust. seca, se añadieron 3-12 unidades de alfa-amilasa CPC por gramo de maíz, con base en sust. seca, de enzima CPR-8, de la misma manera descrita antes, durante la esterilización a un pH de 6,0. En todos los casos se produjo una masa gelificada densa. Usando Thermanyl en experimentos comparables, el medio de maíz se hizo diluido a simple vista, tanto a 15,9% como a 20% con base en sust. seca.

(c) Fermentación de glucoamilasa

Se realizaron varias fermentaciones de glucoamilasa en el fermentador de 40 litros, usando medios nutrientes que contenían 15,9% y 20,0%, con base en sust. seca, de maíz molido licuado y esterilizado. Al nivel de 20% de maíz, con base en sust. seca, se usaron como comparación CPR-8 y Thermanyl. El medio nutriente esterilizado tenía un volumen de 30 litros. Cada lote se cargó con 1,5 litros del agente de inoculación preparado como en el Ejemplo 1 (a), hasta llevar el volumen de trabajo a 31,5 litros. El maíz molido en todos los medios nutrientes se licuó con 1,6 unidades CPC de alfa-amilasa por gramo de maíz, referido a sust. seca. Las fermentaciones de glucoamilasa se efectuaron durante períodos de

15.12.75

5 hasta 168 horas. Periódicamente se tomaron muestras para su análisis. La producción de glucoamilasa usando 15,9% de maíz referido a sustancia seca (licuado con CPR-8) al cabo de 144 horas, fué de aproximadamente 29 unidades por ml, frente a 32 unidades por ml. usando 20,0% de maíz, referido a sust. seca, licuado con CPR-8, a las 144 horas de fermentación. La producción de glucoamilasa usando 20,0% de maíz con base en sust. seca, licuado con Thermamyl, fué de 37 unidades por ml a las 144 horas.

10 Estos ensayos demuestran claramente que pueden alcanzarse mayores producciones de glucoamilasa usando más de 16%, referido a sustancia seca, de maíz molido licuado en el medio, independientemente de la alfa-amilasa usada, y que se obtienen producciones aún mayores de glucoamilasa si se usa maíz molido licuado con una alfa-amilasa derivada del Bacillus licheniformis.

15

20 Se prepararon diez (10) cargas más en el fermentador de 40 litros usando 20% de maíz molido, referido a sust. seca, en el medio nutriente, cinco (5) de ellos usando la enzima CPR-8, y cinco con Thermamyl 60 líquido. Las cargas se hicieron del mismo modo descrito antes, usando 1,5 litros del agente inoculante preparado como en 1 (a). Los resultados de los ensayos se exponen en la Tabla II.

25

15.12.75

13.12.75

TABLA II

FERMENTACIONES DE 40 LITROS DE GLUCOAMILASA

Resultados de lotes de 20% de maíz (sust. seca) y 2,5% (sust. seca) de maceración de maíz, usando alfa-amilasa de CPR-8 ó Thermanyl para la licuefacción.

Lote	Máximo de glucoamilasa U/ml	Máximo de alfa-holo, U/ml	Propor-ción alfa H/GA	Unidades TG/Unidades GA	Edad, horas
<u>Cargas licuadas con Alfa-amilasa CPR-8, 1,6 unidades por gramo de almidón (referido a sust. seca)</u>					
A	35,0	78,8	2,25	-	163
B	35,8	80,5	2,25	0,91	168
C	37,0	67,0	1,81	-	168
D	31,8	52,3	1,65	1,25	168
E	34,6	66,7	1,93	1,12	162
Promedio	34,8	69,1	1,98	1,09	165

Cargas licuadas con Alfa-amilasa Thermanyl

F	33,2	70,5	2,12	0,91	168
					Unidades de alfa-amilasa por de maíz (sust. seca) 4,0

15.12.75

TABLA II (continuación)

Lote	Máximo de glucoami- lasa U/ml	Máximo de alfa-holo, U/ml	Proporción alfa H/GA	Unidades TG/Uni- dades GA	Edad, horas	Unidades de alfa-amilasa por g. de maíz (sust. seca)
G	36,6	65,7	1,79	0,95	140	1,6
H	33,0	69,0	1,95	0,92	162	1,6
I	36,5	71,2	2,24	1,00	162	2,8
J	34,4	77,0	1,93	1,12	162	4,0
Promedio	34,8	70,7	2,00	0,98	159	

Cargas licuadas con Alfa-amilasa Thermamy1

Promedios para
15,9% de maíz
27,5 de medio

54,2 2,01 No se determinó 146

Los resultados de la Tabla II describen los promedios para cada grupo de cinco (5) lotes, en un valor de 34,8 unidades de glucoamilasa por ml. No se observaron variaciones significativas en la proporción alfa-holoa
5 milasa/glucoamilasa ni en la relación transglucosidasa/glucoamilasa. Los resultados demuestran también un aumento de 27% en el nivel de glucoamilasa en el caldo filtrado, independientemente de la enzima de licuefacción usada. Sin embargo, el uso de Thermamyl mejora la economía glo-
10 bal del proceso, gracias a las menores viscosidades, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra los mejores resultados
15 logrados usando una alfa-amilasa derivada del Bacillus li-
cheniformis (Thermamyl 60, líquida) en comparación con CPR-8, en la preparación de un medio nutritivo de glucoamilasa en un fermentador industrial. En un fermentador industrial de 76.000 litros se introdujeron las composi-
20 ciones siguientes, en dos (2) experimentos comparativos independientes.

25

15.12.75

TABLA III

	Medio nutriente	CPR-8	Alfa-amilasa <u>Thermamyl 60</u>
	Agua	45.600 litros	45.600 litros
5	Licor de maceración a 52-54% de sust. seca	2.865 litros	2.865 litros
	Maíz molido a 15% de H ₂ O	12.600 kg.	12.600 kg (b)
	CPR-8	5,85 kg. (a)	-
10	Thermamyl 60 líquido	-	19,12 kg
	Tiempo hasta alcanzar 121°C	8 horas (c)	1,5 horas
15	Tiempo para enfriar	3 horas	1,5 horas

a) Equivalente a 1,6 unidades CPC de alfa-amilasa/gramo de maíz, sust. seca

20 b) 12.600 kg es el nivel máximo posible cuando se usa CPR-8; pero pueden usarse incluso hasta 15.750 kg de maíz molido con Thermamyl, lo que a su vez da mayores rendimientos de glucoamilasa.

25 c) Se requieren ocho (8) horas al usar CPR-8 porque hay que dejar que el contenido se calien-

te hasta 82°C, usando sólo la fricción de los agitadores antes de la adición de CPR-8, por el intervalo limitado de estabilidad. El vapor de agua tiene que añadirse muy lentamente para evitar sacudidas violentas de los fermentadores. No se necesita ninguna de estas precauciones usando Thermamyl.

5

Como se ve en los datos anteriores, el procedimiento de la invención proporciona un método mejorado de fabricar un medio nutriente adecuado para fermentación usando maíz molido licuado por acción de una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana derivada del Bacillus licheniformis. Este procedimiento mejorado para preparar un medio nutriente es adecuado para la mayoría de las fermentaciones que requieren almidón como fuente de carbono. Usando maíz molido licuado con alfa-amilasa bacteriana de Bacillus licheniformis se mejora la economía global de la fermentación, especialmente en el caso de preparar glucoamilasa.

10

15

20

La preparación de enzima de glucoamilasa preparada por el procedimiento de la invención puede usarse en la hidrólisis de almidón para preparar dextrosa y/o jarabes que contienen dextrosa. Un procedimiento adecuado comprende hidrolizar parcialmente almidón con ácido o enzima, y después convertir el almidón parcialmente

25

15.12.75

hidrolizado con la glucoamilasa al grado de conversión deseado. Preferiblemente, el almidón parcialmente hidrolizado se licúa sustancialmente por acción de una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana hasta un E.D. (equivalente de dextrosa) no superior sustancialmente a 20. En la patente de los EE.UU. nº 3.853.706 se describe un procedimiento preferido para preparar el almidón parcialmente hidrolizado, y esta descripción se incorpora aquí como referencia. Se describe otro procedimiento preferido para preparar el almidón parcialmente hidrolizado, que ha de usarse en conjunción con la preparación de glucoamilasa de la invención, en las patentes de los EE.UU, Nos. 3.922.197, 3.922.198, 3.922.199 y 3.922.200, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el día 5 de Diciembre de 1974, bajo el Nº 529.879, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5 1ª. Un procedimiento para la obtención de glucoamilasa, caracterizado por fermentar un microorganismo capaz de producir glucoamilasa en un medio nutriente que contiene una fuente de carbono, comprendiendo dicha fuente de carbono maíz triturado licuado enzimáticamente que tiene un contenido de sólidos de al menos aproximadamente 16% con respecto a sustancia seca.

10 2ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado por emplear el maíz triturado licuado enzimáticamente en una proporción de contenido de sólidos de desde 18% a aproximadamente 22% con respecto a sustancia seca.

15 3ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª ó la reivindicación 2ª, caracterizado por emplear el maíz triturado licuado enzimáticamente en una proporción de contenido de sólidos de aproximadamente 20%, con respecto a sustancia seca.

20 4ª. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por emplear un medio nutriente que contiene una fuente de nitrógeno derivada fundamentalmente de sólidos de licor de maceración de maíz.

15.12.75

5ª. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por licuar el maíz triturado con una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana derivada de Bacillus licheniformis.

5

6ª. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado por emplear una preparación de enzima que está seleccionada del grupo de Bacillus licheniformis NCLB 8061, NICK 8059, ATCC 6598, ATCC 6634, ATCC 8480, ATCC 9945a y ATCC 11945.

10

7ª. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por emplear un microorganismo capaz de producir glucoamilasa, que se deriva del Aspergillus niger.

15

8ª. Un procedimiento según la reivindicación 7ª, caracterizado por emplear un microorganismo que es una cepa mutante.

20

9ª. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, caracterizado por tratar una suspensión acuosa que contiene el maíz triturado a un pH en el intervalo de desde 4,5 a aproximadamente 7,5, y a una temperatura en el intervalo de desde aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C para licuar sustancialmente dicho maíz triturado, y después, en una segunda etapa, aumentar la temperatura del medio nutriente de fermentación hasta una temperatura de al menos aproximadamente

25

15.12.75

110°C, para esterilizar el medio nutriente.

5 10a.- Un procedimiento según la reivindicación 9a, caracterizado por enfriar la suspensión después de la esterilización, inocular en la suspensión enfriada el microorganismo capaz de producir glucoamilasa, y fermentar la suspensión inculada para obtener glucoamilasa.

10 11a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por efectuar la fermentación a un pH en el intervalo de desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0.

12a.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE GLUCOAMILASA.

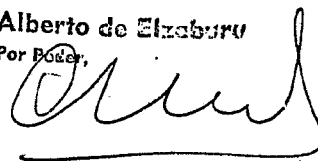
15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

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

20

Madrid, 31. MA. 1977

P.A. Alberto de Elizaburu
Por Poder,



25

23-3-77

JMM/.