



ESPAÑA

ES (11) NUMERO (10) A3
4426801
(22) FECHA DE PUBLICACION
8-6-76



PATENTE DE INTRODUCCION

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C13K
--------------------------	--

(54) TITULO DE LA INVENCIÓN UN PROCEDIMIENTO PARA SACARIFICAR UN HIDROLIZADO DE AMIDON CLARIFICADO.
--

(59) PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION Patente de Estados Unidos Nº 3,630,844 del 28-12-1.971
--

(71) SOLICITANTE (S) A.E. STALEY MANUFACTURING COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Decatur, Illinois 62525, Estados Unidos.

(72) INVENTOR (ES)

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU
--



1

RESUMEN

Un método y composición para obtener jarabes de conversión de almidón que tienen un valor de F.E. mínimo de 77 por cien, un valor de D.E. de aproximadamente 68 por cien como mínimo y un contenido en D. máximo de 47 por cien mediante sacarificación de un hidrolizado de almidón con una composición de enzimas que contiene una diastasa, glucoamilasa y amilo-1,6-glucosidasa.

5

JARABES DE CONVERSION DE ALMIDON

10

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una composición de enzimas y a un método mejorado para obtener jarabes de conversión de almidón que tienen un D.E. (equivalente en dextrosa) elevado, un valor de F.E. (extracto fermentable) elevado y un contenido en D. (destrosa efectiva referida a sustancia seca) limitado. Mas particularmente, esta invención se refiere a un método mejorado y mas seguro para producir convenientemente jarabes de conversión de almidón que tienen un valor de F.E. mínimo de 77 por cien, un valor de D.E. mínimo de aproximadamente 68 por cien y un contenido en D. máximo de 47 por cien.

15

20

La extensa tecnología general para la obtención de jarabes a partir de almidón, con frecuencia conocidos como jarabes de conversión de almidón, es bien conocida. Los jarabes de conversión de almidón que son de particular importancia comercial son los "jarabes de maiz" o jarabes obtenidos a partir de almidón de maiz. Mas recientemente, sin embargo, ha habido una demanda especial de jarabes de conversión de almidón de determinados tipos tales como jarabes que tienen elevados valores de F.E. y D.E. y un contenido

25

30



1 en dextrosa controlado de modo crítico. Tales jarabes de
tipo especial son sustancialmente diferentes del tipo nor-
mal o general de jarabe de maiz.

5 Los jarabes de conversión de almidón de tipo especial
son especialmente idoneos para ciertos usos industriales.
Por ejemplo, tales jarabes se pueden utilizar como un "adi-
tivo de elaboración" en la fabricación de cerveza. Otro uso
es en el llamado "proceso de fermentación" de fabricación
de pan ampliamente utilizado por las panaderías comerciales.
10 Estos jarabes son importantes en las industrias de la ela-
boración y cocción fundamentalmente debido a que contienen
una concentración relativamente alta (por encima de 77 por
cien y preferiblemente por encima de 80 por cien) de sacá-
ridos fermentables (principalmente dextrosa y maltosa), y
15 con todo permanecen transparentes y fluidos en condiciones
normales de almacenamiento. Se esperan otros usos de estos
jarabes de conversión de almidón de tipo especial, particu-
larmente cuando estos jarabes lleguen a ser asequibles a
bajo coste.

20 Desde un punto de vista del sabor es mas conveniente
que el contenido en dextrosa de los jarabes de almidón de
tipo especial se mantenga a un nivel de dulzura elevado.
Sin embargo, hay que tener cuidado en impedir que el conte-
nido en dextrosa exceda del 47 por cien D.S.B., o de lo con-
25 trario tendrá lugar excesiva cristalización o "estructura-
ción" del jarabe. Bajo condiciones de almacenamiento adver-
sas tales como las que se experimentan durante las estacio-
nes de otoño e invierno, se ha observado cristalización a
concentraciones de dextrosa entre 41-45 por cien D.S.B.

30 Un jarabe de tipo especial ideal sería por lo tanto



1 el que fuese alto en sacáridos fermentables y sin embargo
tuviese un contenido en dextrosa justo por debajo de la
concentración que produciría cristalización. Tal jarabe es-
pecial sería, por ejemplo, uno que tuviese un contenido en
5 D. de aproximadamente 40 por cien, un valor de D.E. de apro-
ximadamente 70 por cien y un valor de F.E. mayor que 80 por
cien.

Las siguientes Patentes Norteamericanas son represen-
tativas de la técnica precedente que trata de la obtención
10 de jarabes de maiz de tipos especiales distinguidos de la
glucosa ordinaria o C.S.U. (jarabe de maiz sin mezclar) ob-
tenidos por conversión con ácido puro: Dale y Langlois Pa-
tente Norteamericana Nº 2.201.609, fechada el 21 de mayo
de 1940; Campbell y Mason Patente Norteamericana Nº
15 2.822.303, fechada el 4 de febrero de 1958; Langlois Paten-
te Norteamericana Nº 2.891.869, fechada el 23 de junio de
1969; y Hurst y Turner Patente Norteamericana Nº 3.137.639,
fechada el 16 de junio de 1964. Aunque todas las patentes
anteriores describen un método especial para obtener jara-
20 bes comenzando con un almidón aclarado, por ejemplo, almi-
dón aclarado con ácido y completando a continuación el pro-
ceso de conversión de almidón con enzimas, la Patente Nor-
teamericana Nº 3.137.639 es de singular importancia. Esta
patente describe un método para obtener un jarabe de almi-
25 dón de tipo especial que tiene un D.E. de 68-75 por cien,
un F.E. mínimo de 77 por cien y un D. máximo de 47 por cien
utilizando una mezcla de enzimas que contiene beta-amilasa
y amiloglucosidasa purificada.

Según se indica en la Patente norteamericana Nº
30 3.137.639, existen varios problemas que han de ser supera-



1 dos antes de que se pueda obtener un jarabe que tenga un
valor de F.E. elevado, un valor de D.E. elevado y un con-
tenido en dextrosa inferior al que podría producir la cris-
talización del jarabe. Uno de los problemas específicamente
5 reseñado está en suprimir selectivamente la producción de
dextrosa durante la sacarificación sin interferir excesiva-
mente en la producción de otros sacáridos fermentables. O-
tro problema con el que se tropieza es el control o reduc-
ción de la cantidad de impurezas o cuerpos coloreados pro-
ducidos durante la sacarificación y de este modo minimizar
10 la necesidad de extensivo refinado o purificación del jara-
be. Puesto que un alto porcentaje de los contaminantes en
el producto sacarificado procede de la diastasa de malta
altamente activada, se propone que los contaminantes en el
15 jarabe sean reducidos por disminución de la cantidad de a-
milasa de malta o diastasa de malta utilizadas durante la
sacarificación. Sin embargo, esta situación resulta ser in-
satisfactoria cuando los límites de pH de trabajo entre los
cuales se puede obtener un jarabe con altos D.E. y F.E. son
20 asimismo reducidos. Esto hace difícil la consecución consis-
tente de un jarabe de tipo especial puesto que cualquier
cambio en el pH del sistema de sacarificación generalmente
da lugar a un jarabe que tiene una composición diferente de
la que se desea.

23 Consiguientemente, es un objetivo de esta invención
proporcionar una composición y un método para obtener ja-
rabes de maiz especiales que no solamente superan los pro-
blemas encontrados hasta ahora sino que también es mas efi-
caz y económico que los hasta ahora existentes.

30 Otro objetivo de esta invención es proporcionar una



1 composición y un método para sacarificar el almidón de maiz
en los que el producto sacarificado resultante tiene un va-
lor de F.E. elevado, un valor de D.E. elevado, un contenido
5 en D. inferior al que podría producir la cristalización del
producto sacarificado y que es sustancialmente inferior en
contenido en cenizas y proteínas.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar una
composición y un método para obtener jarabes de maiz que
tienen un valor de D.E. (equivalente en dextrosa) en el in-
10 tervalo de 68-75 por cien, un valor de F.E. mínimo (extrac-
to fermentable) de 77 por cien y un contenido en D. (dextro-
xa) máximo de 47 por cien aproximadamente.

Todavía otro objetivo de esta invención es proporci-
onar una composición y un método para obtener jarabes en los
15 que el contenido en dextrosa se pueda controlar dentro de
un intervalo determinado con relativa facilidad.

Otros objetivos y ventajas de esta invención serán
evidentes de la exposición y los esquemas en los que:

La FIG 1 muestra gráficamente qué efecto tiene una re-
20 ducción de la amilasa de malta sobre el intervalo de pH de
trabajo para la sacarificación del almidón.

La FIG. 2 muestra gráficamente qué efecto tiene la
presencia de amilo-1,6glucosidasa sobre un sistema de sa-
carificación en el que se ha reducido la amilasa de malta.

25 La FIG. 3 muestra gráficamente qué efecto tiene la
reducción de la amilasa de malta sobre el intervalo de pH
de trabajo en la sacarificación de almidón en presencia de
una cantidad constante de alfa-amilasa fungosa.

La FIG. 4 muestra gráficamente qué efecto tiene la
30 presencia de una cantidad constante de amilo-1,6-glucosi-



1 dasa y alfa amilasa fungosa sobre un sistema de sacarifica-
ción en el que se ha disminuido la amilasa de malta.

5 La línea horizontal superior en las figuras anterior-
res representa el pH (6,5-6,7) al que se reduce sustancial-
mente la producción de dextrosa por la acción de glucoamilasa.

 A lo largo de la descripción y de las reivindicacio-
nes de esta solicitud se utilizarán continuamente ciertas
abreviaturas. Se propone para estas abreviaturas los siguien-
tes significados:

10 "D.E." es la abreviatura utilizada ordinariamente pa-
ra el llamado "equivalente en dextrosa" de un jarabe de con-
versión de almidón y constituye una medida del contenido
en azúcares reductores (es decir, dextrosa, maltosa, azúca-
res superiores) y dextrinas en el jarabe expresado como dex-
trosa.

15 "F.E." es la abreviatura utilizada comunmente para
el llamado contenido en "extracto fermentable" de un jara-
be de conversión de almidón. El extracto fermentable se de-
termina por el método de la Fundación de Investigación de
20 Industrias del Maiz (Método E-28 de "Standard Analytical Me-
thods of the Member Companies of the Corn Industries Rese-
arch Fondation", 1958). En este método, una muestra de ja-
rabe se hace fermentar en condiciones cuidadosamente con-
troladas con levadura de panadero. El "extracto fermentable"
25 o "fermentables" es la diferencia entre la sustancia seca
de la muestra original y la sustancia seca que queda después
de la fermentación.

30 La denominación "D" es la abreviatura del contenido
en dextrosa de un jarabe (a distinción del contenido en o-
tros azúcares y dextrina) y se da como el tanto por cien en



1 peso de dextrosa de un jarabe D.S.B. (referido a sustancia)
seca. Los procedimientos estandarizados para determinar
los valores de D.E., F.E. y D. son bien conocidos y están
descritos en varias publicaciones. Si se desea, una aproxi-
5 mación del contenido en maltosa de un jarabe se puede deter-
minar cómodamente restando el contenido en D. del valor
de F.E.

El procedimiento de la presente invención se caracte-
riza de modo general por su rendimiento, exactitud, reproduc-
10 tibilidad en operaciones de pequeña o gran escala, su adap-
tabilidad a transformaciones y equipo de tipo continuo y
discontinuo, y la facilidad con que el producto de trans-
formación por enzimas puede ser refinado y terminado a ja-
rabe acabado. Recordando lo anterior, se pueden obtener có-
15 modamente jarabes especiales mediante las siguientes etapas
y bajo las condiciones que siguen:

1. Se prepara una papilla de almidón mezclando almi-
dón granular con agua a una concentración Baumé entre
20°-25°.

20 2. A continuación se aclara la papilla de almidón a
un D.E. de preferiblemente entre 15-20, mediante el uso de
un ácido o una enzima o mezclas de ambos.

3. A continuación la papilla de almidón aclarado se
ajusta, si es necesario, a un pH entre 4,0 y 6,5, preferible-
25 mente, a un pH entre 4,5 y 5,9 y un contenido en sólidos
entre 20-55 por cien.

4. El hidrolizado de almidón ajustado se sacarifica
mediante la adición de una composición de enzimas que con-
tiene una diastasa o amilasa tal como alfa y/o beta-amila-
30 sa, glucoamilasa purificada sustancialmente exenta de trans-



1 glucosidasa y amilo-1,6-glucosidasa y mantenimiento del hi-
drolizado a una temperatura entre 53,3-56°C durante un pe-
riodo de tiempo que oscila desde 24 a 100 horas o durante
un tiempo suficiente para obtener un jarabe que tenga un
5 D.E. entre 68-75 por cien, un F.E. mínimo de aproximadamen-
te 77 por cien y un contenido en D. máximo de aproximadamen-
te 47 por cien.

5. Después que se obtiene el jarabe deseado las enzi-
mas se desactivan calentando la mezcla a una temperatura
10 entre 73,9-93,3°C.

6. Finalmente el jarabe se purifica y concentra a una
concentración de 40º-45º Baumé y a un contenido en sólidos
de 78-85 por cien.

De las seis etapas anteriormente descritas, la mas
15 importante es la etapa de sacarificación.

La etapa de sacarificación que es la etapa en la que
un hidrolizado de almidón aclarado se transforma en un ja-
rabe que tiene una composición especial, comprende el con-
tacto de un hidrolizado de almidón con una composición de
20 enzimas que contiene (a) diastasa (una enzima diastática
capaz de hidrolizar el almidón a maltosa y sacáridos mas
altos tal como beta y/o alfa amilasa, (b) glucoamilasa (una
enzima capaz de hidrolizar el almidón a dextrosa) y (c) a-
milo-1,6-glucosidasa (una enzima capaz de hidrolizar la
25 fracción amilopectínica del almidón en sus uniones 1,6-glu-
cosídicas).

La enzima diastasa se puede obtener de una serie de
fuentes, por ejemplo, plantas, animales o microorganismos,
y puede ser impura o purificada. Una fuente cómodo de dias-
30 tasa y particularmente una que tiene una elevada concentra-



1 ción de beta-amilasa, es la malta de cebada. La malta de
cebada es utilizable a partir de una serie de fuentes co-
merciales con diversos nombres patentados, por ejemplo,
5 Fromal-72, cebada germinada altamente activa desde el pun-
to de vista enzimático, producida por Froedtert Malt Compa-
ny, Milwaukee, Wisconsin. También se pueden utilizar otras
diastasas, tales como alfa-amilasas fungosas. Una prepara-
ción comercial de alfa-amilasa fungosa típica es la Rhozyme
10 33 de Rhom & Haas. También se pueden utilizar con ventaja
alfa amilasas obtenidas a partir del organismo *Aspergillus*
oryzae o alfa amilasas bacterianas, tales como las encontra-
das en la Rhozyme H-39 de Rhom & Haas. Una mezcla o combi-
nación de amilasas, por ejemplo, una mezcla de amilasas de
malta y fungosas se ha encontrado que es particularmente
15 útil para obtener jarabes que tienen valores elevados de
F.E. y D.E. y un contenido en D. controlado.

La cantidad de diastasa necesaria en combinación con
glucoamilasa y amilo-1,6-glucosidasa para sacarificar el
almidón para obtener un jarabe que tiene valores elevados
20 de F.E. y D.E. en un contenido en D. controlado variará de-
pendiendo de la fuente, pureza, etc. de la enzima. Sin em-
bargo, en la mayor parte de los casos, si se utiliza una
diastasa tal como, por ejemplo, una alfa-amilasa, se utili-
zan cantidades tan bajas como 0,001 por cien, y preferible-
mente cantidades entre 0,01 y 0,03 por cien de la sustan-
25 cia seca del almidón. Cuando se utiliza como fuente de dias-
tasa una cebada germinada altamente activa desde el punto
de vista enzimático, se han utilizado concentraciones de
malta tan bajas como 0,1 por cien, y es posible que, en con-
30 diciones adecuadas, se pueda utilizar aun menos. Preferible-



1 mente se utilizan cantidades de 0,1 a 0,5 o 0,1 %. Aunque
se pueden utilizar cantidades mayores, es decir, cantida-
des superiores a 1,0 por cien, estas concentraciones mayo-
res no son necesarias cuando hay amilo-1,6-glucosidasa en
5 el sistema de sacarificación. Esta ventaja se muestra grá-
ficamente en la FIG. 2. Además, cuando se utiliza malta co-
mo fuente de diastasa, la cantidad se debe mantener prefe-
riblemente en un mínimo y en general no debe exceder del
1,0 por cien debido a la contribución de la malta a la pro-
10 ducción de cuerpos coloreados y de otros contaminantes en
el jarabe.

Como también se ha indicado anteriormente una de las
ventajas de esta invención es que, cuando hay amilo-1,6-glu-
cosidasa en la composición de enzimas, se requieren can-
15 tidades de malta sustancialmente menores para la sacarifi-
cación. Utilizando cantidades de malta sustancialmente me-
nores, se obtiene un jarabe que tiene un contenido en ce-
nizas mucho mas bajo y menos cuerpos coloreados. Esto per-
mite que la resina de cambio iónico, que se utiliza normal-
20 mente en la purificación de jarabes de conversión de almi-
dón, funcione durante largos periodos de tiempo sin rege-
neración. Antes de esta invención era extremadamente difí-
cil mantener la producción comercial de estos jarabes de
almidón de tipos especiales debido a que cuando se reducía
25 el contenido en malta, se reducía de igual modo el interva-
lo de pH de trabajo para la sacarificación. Como se mues-
tra en la FIG. 1, el intervalo de pH de trabajo para obte-
ner un jarabe que tenga un D.E. de aproximadamente 70 por
cien, un contenido en D. de aproximadamente 40 por cien y
30 un valor de F.E. mayor que 80 por cien es extremadamente



1 estrecho (0,2-0,3 unidades de pH) cuando se emplea en el
sistema de sacarificación aproximadamente el 0,2 por cien
de malta. Sin embargo, como se muestra también en la FIG.
1, si el contenido en malta se aumenta en un factor de a-
5 proximadamente 10 o a aproximadamente 2,0 por cien, el in-
tervalo de pH de trabajo se puede aumentar a aproximadamen-
te 1,5-1,7 unidades.

En la FIG. 2 se muestra que el intervalo de pH de
trabajo se amplia sustancialmente utilizando, además de la
10 malta, una pequeña cantidad de amilo-1,6-glucosidasa (0,5
unidades). La FIG. 2 muestra que el intervalo de pH de tra-
bajo para 0,2 por cien de malta se puede ampliar desde a-
proximadamente 0,2 a aproximadamente 1,5 unidades. Esto au-
menta la diferencia en la variación posible de pH en tanto
15 como 700 por cien. Por supuesto, la ventaja de poder dis-
poner de este intervalo de pH de trabajo mas amplio es que
los operarios de una unidad de sacarificación de jarabe co-
mercial son capaces de obtener de modo constante y con un
grado elevado de fiabilidad, jarabes que tienen los valores
de D.E., F.E. y D. particulares deseados. Antes de esta
20 invención, esta constancia y fiabilidad se podían conseguir
aumentando el contenido en malta, pero esto también aumen-
ta, como se ha indicado anteriormente, el contenido en ce-
nizas y los cuerpos coloreados presentes en el jarabe y
25 de este modo se aumentan los costos de purificación.

Las FIG. 3 y 4 muestran que este intervalo de pH de
trabajo todavía puede ser ampliado utilizando una pequeña
cantidad de alfa amilasa fungosa en combinación con amila-
sa (beta) de malta.

30 La enzima glucoamilasa se puede obtener cuando se ne-



1 cesite o se puede adquirir en una serie de fuentes comercia-
les. Así, se puede obtener siguiendo los procedimientos
descritos por Ligett y otros, Patente Norteamericana N^o
2.881.115 y Langlois y otros, Patente Norteamericana N^o
5 2.893.921. Se ha descubierto que tales preparaciones de glu-
coamilasa normalmente contienen cantidades apreciables de
la enzima transglucosilasa (o transglucosidasa) y que ésta
tiene que ser de modo sustancial totalmente extraída antes
de que la glucoamilasa pueda ser utilizada en la producción
10 de jarabes de elevados D.E.-F.E. de acuerdo con esta in-
vención. Por supuesto, si la preparación está sustancial-
mente libre de transglucosilasa no es necesaria purifica-
ción. Si se utiliza glucoamilasa no purificada que contie-
ne apreciable transglucosilasa el contenido en dextrosa (D.)
15 del jarabe resultante superaría la especificación del má-
ximo de 47 por cien a 67-75 por cien de D.E. y los valores
de F.E. serían sustancialmente inferiores al 77 por cien
mínimo.

Se conocen varios procedimientos para purificar la
20 glucoamilasa hasta hacerla sustancialmente libre de la trans-
glucosilasa. Procedimientos de purificación adecuados se
describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 3.067.108
y 3.047.471 de Hurst y otros y en la Patentes Norteamerica-
nas Nos. 2.967.804 y 2.970.086 de Kerr. Con algunas prepa-
25 raciones de glucoamilasa, por ejemplo la Diazyme L de los
Laboratorios Miles, según se indicó anteriormente, es con-
veniente utilizar, además de una amilasa de malta, una pe-
queña proporción de una alfa-amilasa fungosa, por ejemplo,
desde 0,002 a 0,2 por cien en peso del almidón que se some-
30 te a la conversión durante la sacarificación. El uso de la



1 alfa-amilasa tiende a limitar y, de este modo, mejor con-
trollar la producción de dextrosa. Información adicional que
incluye el efecto que tiene la transglucosidasa sobre la
glicoamilasa se puede encontrar en Cereal Chemistry, Vol.
5 43, páginas 658-669 (1966).

Se deben utilizar desde aproximadamente 1 a 10 o mas
unidades (u.) de glucoamilasa purificada por gramo de sólidos
de almidón, siendo una unidad de glucoamilasa la cantidad
de enzima que convertiría 100 miligramos de almidón e-
sencialmente en dextrosa en 48 horas a 60°C y pH 4,0. Can-
tidades en exceso de glucoamilasa han de ser evitadas con
el fin de minimizar el coste de purificación para eliminar
cuerpos coloreados y otros contaminantes indeseados (por
ejemplo proteína) del jarabe.

15 La enzima amilo-1,6-glucosidasa, con mucha frecuen-
cia conocida como "pullulanasa" es una enzima capaz de hi-
drolizar selectivamente los enlaces alfa-1,6-glucosídicos
de la fracción amilopectínica del almidón. Otras enzimas
capaces de hidrolizar enlaces alfa-1,6-glucosídicos se co-
nocen en la bibliografía como "iso-amilasa" y "enzima R".

20 La obtención de una enzima que presenta actividad
a la amilo-1,6-glucosidasa fué relatada por Bender & Wa-
llenfels en Biochemische Zeitschrift, Vol 334, páginas 79-
95 (1961). Otra información que incluye el uso y obtención
de esta enzima se puede encontrar en Methods of Enzymology,
25 Vol. 8, páginas 555-559 (1966). De acuerdo con las referen-
cias anteriores, la amilo-1,6-glucosidasa se puede obtener
a partir del organismo *Aerobacter aerogenes*. Ciertas cepas
del organismo, *Aerobacter aerogenes*, se han descrito como
30 que son fuentes particularmente buenas para la obtención



1 de esta enzima. Por ejemplo, *Aerobacter aerogenes* (U-58) que se manifiesta ser un descendiente directo de la cepa original aislada por Bender & Wallenfels se ha encontrado que es una fuente de esta enzima particularmente buena.

5 También se pueden utilizar varios mutantes de *Aerobacter aerogenes* (U-58) inducidos por ultravioleta. Otras cepas descritas de *Aerobacter aerogenes* que se pueden utilizar son *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 y ATCC 15050.

10 Preparaciones de amilo-1,6-glucosidasa o pullulanasa se pueden obtener a partir del organismo *Aerobacter aerogenes* por métodos de cultivo conocidos. Una técnica adecuada se describe en la publicación de Bender y Wallenfels previamente citada. Si se desea, la preparación impura se puede purificar antes de usarla. Sin embargo, la utilidad de
15 la enzima en el procedimiento de esta invención no está restringida a preparaciones de determinada pureza específica. Sin embargo, evidentemente, el uso de una enzima sustancialmente exenta de contaminates sería ventajoso.

20 La cantidad de amilo-1,6-glucosidasa utilizada no es especialmente crítica y depende en una gran medida de la concentración del almidón en el hidrolizado de almidón, la actividad de la enzima, las condiciones de la reacción, etc. Sin embargo, generalmente, se utilizan desde aproximadamente 0,05 a 1,25 unidades de amilo-1,6-glucosidasa por
25 gramo de almidón, y preferiblemente entre 0,2 y 0,7 unidades/g de almidón. Una unidad de amilo-1,6-glucosidasa se define como la cantidad de enzima presente en 1,0 ml de disolución que, con exceso de pullulana como sustrato en condiciones de ensayo patrón, aumenta el valor de reducción
30 en una hora a 45°C a un valor que es equivalente a un mg



1 de maltosa.

La sacarificación del hidrolizado de almidón clarificado mas eficiente tiene lugar cuando el hidrolizado de almidón se clarifica a un D.E. de menos que 35 y tiene un contenido en sólidos de menos que 55 por cien. Durante la sa-
5 carificación (en presencia de encimas) el hidrolizado de almidón se mantiene a un pH entre 3,5 y 7,0 y a una temperatura entre 25 y 60°C. Preferiblemente el hidrolizado de almidón se mantiene a un pH entre 4,5 y 6,5 y a una temperatura entre 30 y 50°C. En estas condiciones la sacarifica-
10 ción normalmente es completa después de un periodo de aproximadamente 30 a 80 horas.

Los ejemplos siguientes son simplemente incorporaciones ilustrativas de esta invención y no se aplican como li-
15 mitaciones específicas de ésta.

EJEMPLOS 1-10

A una papilla de almidón de maiz de 20°-22° Baumé (Be.) en agua, se añade con agitación el 0,1 por cien de ClH referido al peso de sustancia seca del almidón. Esta
20 proporción se obtiene mezclando 0,526 Kg de ClH de 20° Be. con 454,5 litros de papilla de almidón de 21° Be. El pH de la papilla resultante es 2,2. La papilla se reduce a 15-19 D.E. utilizando vapor a 3,87 atmósferas en un calentador de inyección de vapor hasta aumentar la temperatura a 150°C
25 que se mantiene durante 3-5 minutos. Después de descargar a la presión atmosférica la operación caliente se neutraliza a pH 4,5 a 5,0 por adición de una disolución de cenizas de sosa. Esto requiere aproximadamente 0,15 por cien D.S. de cenizas de sosa referido al peso D.S. de los sólidos del
30 jarabe. Es satisfactoria una disolución de cenizas de sosa



1 que contiene 0,125 kg de cenizas de sosa por litro. Después
de la neutralización, la operación se enfría a 53,3-55,6°C
antes de continuar el proceso.

5 Se determina el valor D.S. de la suspensión de hidro-
lizado enfriada, y se añaden a la misma cantidades predeter-
minadas, según se describe en la Tabla I, de cebada germi-
nada altamente activa (amilasa de malta de Wallerstein),
glucoamilasa y amilo-1,6-glucosidasa. La preparación de glu-
coamilasa (Diastasa 73 de Rohm & Haas) se diluye con agua
10 a aproximadamente 100 u./ml y se purifica con 0,2 por cien
p/v de lignina a pH 4 según se describe en la Patente Nor-
teamericana Nº 3.047.471. Este tratamiento de purificación
sirve para eliminar esporas fungosas, color y transglucosi-
dasa. Se añade la amilo-1,6-glucosidasa en forma de una di-
15 solución acuosa. La amilo-1,6-glucosidasa se obtiene a par-
tir del organismo *Aerobacter aerogenes* por el procedimien-
to descrito en Biochemische Zeitschrift, Vol 334, páginas
79-95 (1961). La malta se añade en forma de polvo seco. Con
las enzimas añadidas la papilla de almidón se transforma a
20 53,3-55,6°C y pH 5,6-5,9 durante 48 horas. Al final de las
48 horas, la conversión por enzimas se detiene rociando con
suficiente vapor para aumentar la temperatura a 79,4°C en
una hora, temperatura que se mantiene durante aproximada-
mente una hora.

25 A continuación la operación de jarabe se purifica con
resinas y/o carbón y se evapora hasta 43° Be. (82,5 por
cien D.S.), se determinan los valores D., D.E. y F.E. de los
jarabes para cada una de las combinaciones de enzimas y se
detallan en la Tabla I.

30



TABLA I

Ejemplo	Malta %	Glucosilasa, unidades/g	Amilo-1,6-glucosidasa, unidades/g	48 horas			
				% D.E.	% D.	% F.E.	% D/D.E.
5	1	2,0	2,6	72,1	46,6	81,8	0,65
	2	2,0	2,4	68,9	42,1	79,1	0,62
	3	1,0	2,8	72,5	53,4		0,74
	4	0,5	3,0	74,3	57,2		0,77
	5	0,25	3,0	70,0	54,8		0,78
10	6	0,25	2,5	70,0	43,0	78,2	0,61
	7	0,5	1,5	68,2	42,1	81,9	0,62
	8	0,5	2,0	69,7	44,6	79,5	0,64
	9	0,5	3,0	69,3	37,7	86,4	0,54
	10	1,0	2,8	71,3	43,2	83,8	0,61

15 Se puede ver a partir de los ejemplos anteriores que, en ausencia de amilo-1,6-glucosidasa, se necesita aproximadamente 2,0 por cien de malta en combinación con glucoamilasa si se ha de obtener un jarabe de tipo especial que tenga valores de D.E. y F.E. alrededor de 70 y 80, respectivamente, y un contenido en D. de aproximadamente 40-45. Se puede ver además que cuando se reduce el contenido en malta (beta-amilasa) presente durante la sacarificación (ejemplos 1-5), aumenta el contenido en dextrosa del jarabe. A un contenido en dextrosa de aproximadamente 45-47 por cien tiene lugar generalmente la cristalización o estructuración del jarabe.

20 Sin embargo, como se demuestra mediante los ejemplos 6-10, la presencia de amilo-1,6-glucosidasa controla la producción de dextrosa aun a concentraciones de malta inferiores. Esto también se demuestra por la relación D./D.E. tam-

25

30



1 bién descrita en la Tabla I. Un jarabe de tipo especial que
 tiene relaciones D./D.E. entre 0,5 y 0,65 y valores de F.E.
 de aproximadamente 80 por cien es el tipo de jarabe mas a-
 5 decuado para utilizar en la industria de la elaboración de
 cerbeza y de la cocción.

EJEMPLOS 11-20

Estos ejemplos muestran el efecto que tiene la amilo-
 1,6-glucosidasa sobre el intervalo de pH de trabajo para
 obtener un jarabe de almidón de maiz que tiene un D.E. de
 10 por lo menos 70 por cien, un contenido en D. de 40 por cien
 y un valor de F.E. de por lo menos 80 por cien. Se sigue
 el procedimiento del ejemplo I excepto en las modificacio-
 nes descritas en la Tabla II. Los resultados se describen
 en la Tabla II a continuación y se expresan gráficamente en
 15 las FIG. 1 y FIG. 2.

TABLA II

Ejemplo	% malta	Glucosa, unidades/g	Amilo-1,6-glucosidasa, unidades/g	Intervalo de pH de trabajo para obtener un jarabe que tiene un D.E. de 70 %, D. de 40 % y F.E. de 80 %
20	11	0,2	2,1-3,0	6,4-6,5
	12	0,2	2,1-3,0	0,5 5,4-6,5
	13	0,5	2,1-3,0	6,2-6,5
	14	0,5	2,1-3,0	0,5 4,8-6,5
25	15	1,0	2,1-3,0	5,6-6,5
	16	1,0	2,1-3,0	0,5 4,4-6,5
	17	1,5	2,1-3,0	5,2-6,5
	18	1,5	2,1-3,0	0,5 4,3-6,5
	19	2,0	2,1-3,0	5,0-6,5
30	20	2,0	2,1-3,0	0,5 4,2-6,5



1

EJEMPLOS 21-25

5

Los ejemplos siguientes muestran que toda o parte de la malta (beta-amilasa) se puede sustituir por alfa amilasa fungosa. Los ejemplos se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1 con la excepción de las modificaciones descritas en la Tabla III que sigue

TABLA III

10

Ejemplo	pH	Unidades/ g			48 horas		
		Amilasa fungosa (alfa)	gluco-amilasa	amilo-1,6-glucosidasa	Tanto por ciento D.E.	Tanto por ciento D	Tanto por ciento F.E.
21	5,9	0,15	2,4	0,5	74,4	46,9	83,6
22	5,9	0,31	2,4	0,5	73,8	45,8	83,4
23	6,1	0,15	2,4	0,5	71,1	41,6	82,5
24	6,1	0,31	2,4	0,5	70,8	39,9	82,5
25	6,2	0,05 [±]	2,5	1,4	70,6	31,4	95,0

15

± También se añadió el 1 % de malta

20

Puesto que se pueden hacer muchas incorporaciones de esta invención y puesto que se pueden hacer muchos cambios en las incorporaciones descritas, lo que precede se interpreta como ilustrativo y la invención se define por las reivindicaciones siguientes.

En resumen, la Patente de Introducción que se solicita deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

25

1. Un procedimiento para sacarificar un hidrolizado de almidón clarificado que consiste en poner en contacto dicho hidrolizado de almidón con una combinación de enzimas que consta de diastasa, glucoamilasa y amilo-1,6-glucosidasa en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir un jarabe de conversión de almidón que tenga

30

ME



- 1 un valor del equivalente en dextrosa mínimo de aproximada-
mente 68 por cien, un valor de extracto fermentable mínimo
de aproximadamente 77 por cien y un contenido en dextrosa
máximo de aproximadamente 47 por cien.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que
la diastasa es principalmente una beta-amilasa.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que
la beta-amilasa se obtiene a partir de malta de cebada.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que
la glucoamilasa esta sustancialmente exenta de transgluco-
sidasa.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que
la diastasa es principalmente una alfa amilasa fungosa.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que
el jarabe de conversión de almidón tiene un valor del equi-
valente en dextrosa en el intervalo de aproximadamente 68-
75 por cien.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que
el jarabe de conversión de almidón tiene un valor del equi-
valente en dextrosa de por lo menos 70 por cien, un valor
del extracto fermentable mínimo de aproximadamente 80 por
cien y un contenido en dextrosa máximo entre aproximadamen-
te 41-45 por cien.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que
la suspensión de hidrolizado de almidón tiene un D.E entre
aproximadamente 15 a 20, un pH entre aproximadamente 4,0 y
6,5, un contenido en sólidos de aproximadamente 20 a 55 por
cien de almidón en peso del almidón sobre una base de sus-
tancia seca y en el que la digestión del hidrolizado de al-
midón es durante aproximadamente 24-100 horas a una tempe-
- 30

MG



1 ratura inferior a la que desactivaría las enzimas de saca-
rificación.

5 9. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que
se utilizan por lo menos aproximadamente 0,1 por cien en
peso de amilasa de malta altamente activada referido a sus-
tancia seca, aproximadamente 1,5 unidades de glucoamilasa
por gramo de sólidos de almidón y por lo menos 0,1 unidades
de amilo-1,6-glucosidasa por gramo de sólidos de almidón
para sacarificar dicha suspensión de hidrolizado de almidón
10 clarificado.

10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que
la suspensión de hidrolizado de almidón se clarifica con
ácido.

15 11. El procedimiento de la reivindicación 10 en el que
la amilasa de malta se sustituye totalmente o en parte por
una cantidad equivalente de una alfa amilasa fungosa.

12. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que
la alfa amilasa fungosa se sustituye totalmente o en parte
por una alfa amilasa bacteriana.

20 13. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que
la amilo-1,6-glucosidasa se obtiene a partir del organismo
Aerobacter aerogenes.

25

30



1

14. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita UN PROCEDIMIENTO PARA SACARIFICAR UN HIDROLIZADO DE ALMIDON CLARIFICADO.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva, que consta de veintitrés páginas mecanografiadas y dibujos que se adjuntan.

10

Madrid, 8 de Junio de 1.976

BERNARDO UNGRIA

E. P.

15

20

25

MGE

30

FIG.1

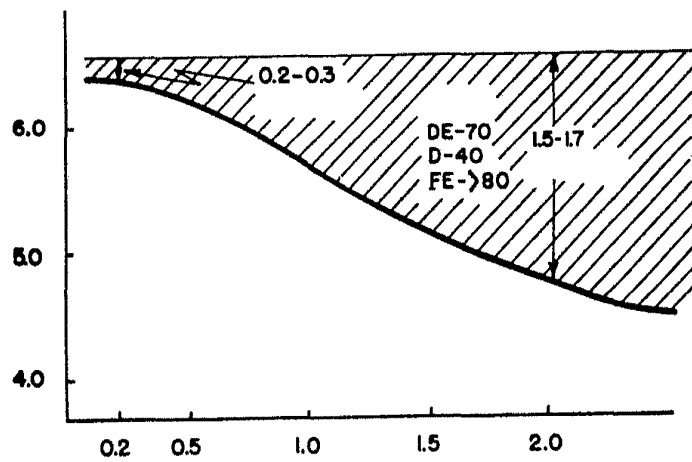
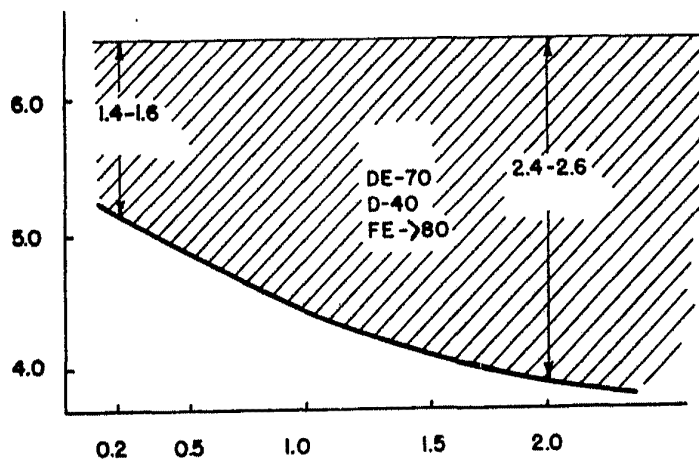


FIG.2



ESCALA VARIABLE
Madrid, 8 junio 1.976
BERNARDO UNGRÍA
D.P.

FIG.3

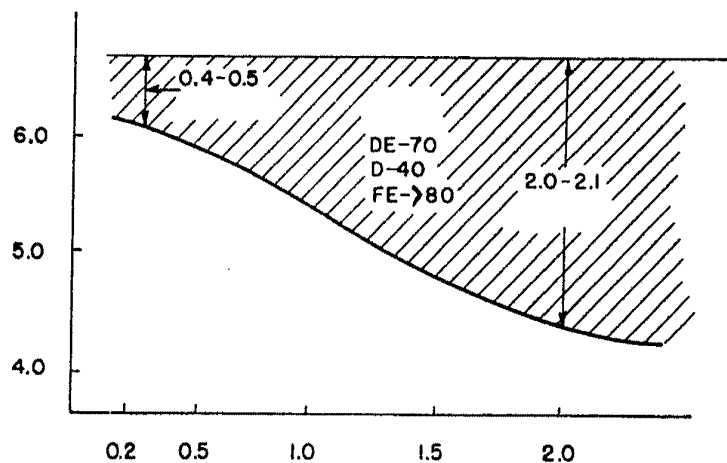
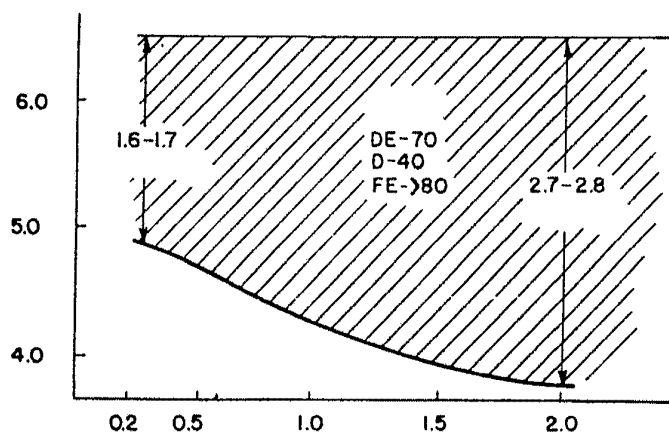


FIG.4



ESCALA VARIABLE
Madrid, 8 junio 1.976.
BERNARDO UNGRIA

P.D.