

20 JUL. 1978

ES

NUMERO	460.304
FECHA DE PRESENTACION	1-7-1977

A1



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

PRIORITY INFORMATION		
90 PRIORIDADES:	91 NUMERO	92 FECHA
	27749/76	2-7-76
		93 PAIS
		Gran Bretaña
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	69 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C13K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PRODUCTO DE ENZIMA SACARIFICANTE INMOVILIZADA EN FORMA DE PARTICULAS"		
71 SOLICITANTE (ES)		
NOVO INDUSTRI A/S		(51917/GL)
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
NOVO Allé, DK-2880 Bagsvæ rd, Dinamarca		
72 INVENTOR (ES)		
Shmuel Amotz, Tage Kjær Nielsen, Poul Børge Rosenius Poulsen y Barrie Edmund Norman		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ		(P-66.282)

1 La presente invención se refiere a enzimas insolubilizadas y a un procedimiento para preparar productos de enzima insolubilizada.

5 Más en particular, la presente invención se refiere a formas en partículas, físicamente estabilizadas, de enzimas sacarificadoras insolubilizadas elegidas del grupo que consta de amiloglucosidasa y alfa-amilasa maltógena, ambas usualmente de origen fúngico, y a un procedimiento para preparar tales productos de enzima insolubilizada.

10 La insolubilización (o inmovilización) de enzimas solubles en agua extracelulares e intracelulares, es decir, la fijación de enzimas catalíticamente activas (nativas) en una estructura insolubilizada, sólida o cuasisólida, con forma o susceptible de que se le dé forma, ha adquirido importancia en aumento, tanto tecnológica como económica, como medio de hacer a un producto concreto de enzima utilizable de nuevo en procedimientos de tipo discontinuo, o adecuado para un modo continuo de operación, en un llamado reactor de enzimas.

20 Durante los años recientes se han dedicado particularmente esfuerzos al desarrollo de tecnología de inmovilización en la industria de tratamiento de almidón, en relación con la fabricación de productos tales como jarabes con mucha dextrosa y mucha fructosa. Ultimamente, la importancia relativa del último ha ido en aumento en las industrias de alimentos y afines, siendo el jarabe con mucha fructosa un sustituto ventajoso de la sacarosa y del (menos dulce) jarabe con mucha dextrosa. Dos tipos adicionales de jarabe de azúcar basados en hidrólisis de almidón, y que tienen ambos un contenido sustancial de maltosa, con

1   cretamente el jarabe con mucha maltosa y de alta conver-  
sión, están siendo usados en magnitud en aumento, particu-  
larmente en las industrias de pastelería (azúcar dura) y  
conservera, respectivamente.

5   El procedimiento industrial global para convertir  
almidón, a través de jarabe con mucha dextrosa, en jarabe  
con mucha fructosa comprende tres etapas consecutivas,  
concretamente el procedimiento de disminución de viscosi-  
10   dad o licuación del almidón a dextrinas, catalizado por  
ácido y/o por una alfa-amilasa bacteriana, seguido por  
sacarificación a un jarabe con mucha dextrosa, y luego  
conversión de este último en jarabe con mucha fructosa,  
estando cada procedimiento catalizado por su enzima espe-  
cífica, es decir, amiloglucosidasa y glucosa-isomerasa  
15   respectivamente. Aunque el desarrollo tecnológico más re-  
ciente ha proporcionado procedimientos continuos para tan-  
to la primera como la tercera etapa de la anterior secuen-  
cia de producción, la sacarificación industrial es aún  
predominantemente un procedimiento de tipo discontinuo.  
20   El material de partida de un tipo de jarabe con mucha mal-  
tosa es también almidón licuado producido por cualquiera  
de los métodos que se acaban de describir. Sin embargo, en  
este caso la etapa de sacarificación subsiguiente, que da  
25   como resultado un jarabe de alto contenido de maltosa ( y  
que usualmente contiene relativamente poca glucosa), se  
efectúa mediante una amilasa maltógena, preferiblemente  
una alfa-amilasa fúngica. Como la sacarificación glucóge-  
na, el correspondiente procedimiento maltógeno se efectúa  
usualmente de forma discontinua, usando la enzima soluble.  
30   Aunque la ventaja de disponer de una secuencia de

1 producción totalmente continua es evidente, el desarrollo de técnicas industriales de reactor de enzimas que impliquen el uso de amiloglucosidasa insolubilizada en la etapa de sacarificación solo está en un estado preliminar.

5 La técnica anterior contiene un cierto número de referencias a la insolubilización de amiloglucosidasa, por ejemplo uniendo la enzima a soportes inorgánicos u orgánicos insolubles. Sin embargo, solo pocos de estos métodos parecen haber sido desarrollados más allá de la  
10 escala de laboratorio. Entre los métodos que aparentemente han pasado de esa etapa se debe hacer mención específica de la inmovilización de amiloglucosidasa por unión covalente a partículas porosas de material de vidrio o cerámica. En relación con esto se hace referencia a un  
15 artículo reciente publicado por D.D. Lee y otros, en "Die Stärke", vol. 27 (1975), págs. 384-387.

En un procedimiento continuo en el que una columna de tamaño de instalación piloto se rellenó con este producto concreto de enzima, y se alimentó con soluciones de  
20 dextrinas disponibles en el comercio, se consiguieron grados de conversión a dextrosa que se acercaron a la conversión mínima de aproximadamente 92 por ciento que generalmente se requiere en un procedimiento de sacarificación discontinua con amiloglucosidasa soluble. Sin embargo, los  
25 análisis del producto indicaron que las reacciones de reversión, es decir, repolimerización, catalizada por amiloglucosidasa, de glucosa a maltosa, isomaltosa y oligómeros superiores, tienen lugar en el procedimiento en columna en mayor magnitud que en el procedimiento discontinuo con enzima libre.  
30

1 El fenómeno de reversión aumentada que se encuen  
tra con un producto de enzima inmovilizada de este tipo  
parece ser, al menos en parte, una desventaja inherente  
al uso de materiales porosos de soporte de enzima. Clara  
mente, la estructura porosa contribuye en grado muy sus-  
5 tancial al área superficial total que se presta a la unión  
de enzima, y en consecuencia a la máxima actividad enzimá  
tica que se puede obtener con el producto de enzima inmo-  
vilizada.

10 Sin embargo, la alta concentración de amilogluco-  
sidasa unida a la superficie de poros del soporte, combi-  
nada con una velocidad de difusión reducida dentro de los  
poros, da inevitablemente como resultado unas altas concen-  
traciones locales de glucosa, constituyendo así condicio-  
15 nes favorables para la promoción de procedimientos enzimá-  
ticos que tengan altos valores  $K_m$ . Esto es exactamente lo  
que sucede con las indeseables reacciones de reversión, y  
particularmente aquellas en las que se forman isomaltosa  
e isomaltriosa.

20 Un producto de alfa-amilasa maltógena insolubiliza-  
da, preparado uniendo la enzima soluble a aminoetilcelulo-  
sa mediante glutaraldehido, está expuesto en la patente de  
los EE.UU. nº 4.011.137 (Thompson y otros). Sin embargo,  
según esta anterioridad, el uso a que se destina la enzi-  
25 ma inmovilizada está limitado al aumento del grado de con-  
versión de almidón dextrinizado a glucosa, mediante una  
preparación de amiloglucosidasa inmovilizada de forma si-  
milar, efectuándose el procedimiento de sacarificación me-  
diante una mezcla de las dos enzimas inmovilizadas. En nin-  
30 gún sitio de la patente se pone en evidencia el uso de la

1 alfa-amilasa maltógena inmovilizada para la producción de un jarabe con mucha maltosa.

5 Una desventaja adicional del uso de una enzima sa carificadora inmovilizada en partículas, donde la enzima está unida a un material poroso o reticular que es esencialmente homogéneo en toda la estructura en partículas, es previsible cuando se tiene en cuenta la heterogeneidad de tamaño molecular del almidón dextrinizado que sirve como sustrato. Todas las dextrinas, ya sean producidas por hidrólisis ácida o enzimática de almidón, contienen fracciones sustanciales de oligómeros de glucosa. Normalmente, el procedimiento de disminución de viscosidad del almidón se detiene cuando la longitud media de cadena del hidrolizado está comprendida entre 6 y 10 restos de glucosa, y es concebible que el simple impedimento estérico impida la difusión de las moléculas de dextrina, mayores, a los puntos de enzima incrustados más allá de una cierta profundidad dentro de la estructura de partícula porosa o reticular.

15 20 Un objeto de la presente invención es superar, o al menos mitigar, las principales desventajas que se encuentran con los productos de enzima sacarificadora inmovilizada de la técnica anterior, antes descritos, proporcionando un producto insolubilizado que tiene características de procedimiento esencialmente similares a las de la enzima soluble, independientemente de que el producto inmovilizado se use en un procedimiento discontinuo o en un modo de operación continuo.

25 30 En el caso de la amiloglucosidasa inmovilizada, este requisito implica que se pueda efectuar un procedi-

1 miento continuo de sacarificación bajo condiciones de pro-  
cedimiento tan aceptables en la práctica (p.ej. en térmi-  
nos de composición y caudal de la alimentación de dextrina)  
que se produzca una concentración de glucosa de al menos  
5 92 por ciento, no excediendo la concentración total de  
disacáridos (maltosa e isomaltosa) y trisacáridos (prin-  
cipalmente panosa e isomaltotriosa) de aproximadamente 4  
y 1 por ciento, respectivamente.

10 En el caso de la alfa-amilasa maltógena inmovili-  
zada, los parámetros de conversión correspondientes reque-  
ridos serían: aproximadamente 40-60 por ciento de maltosa,  
25-35 por ciento de maltotriosa y, preferiblemente, menos  
de 10 por ciento de glucosa.

15 Dado que las enzimas sacarificadoras solubles de  
que se dispone en el comercio son relativamente baratas y  
muy activas, otro objeto preferible, pero no esencial, de  
la presente invención es proporcionar productos insolubi-  
lizados económicamente favorables. La consecución de este  
objeto necesita la utilización de un soporte y otros mate-  
20 riales auxiliares relativamente baratos y fácilmente dispo-  
nibles en el comercio, y además la consecución de sustan-  
ciales recuperaciones de actividades de enzima en el pro-  
cedimiento de inmovilización. Además, desde un punto de  
vista toxicológico, todos los materiales usados deben ser  
25 aceptables para fines de tratamiento de alimentos.

30 En breve, estos objetos se consiguen según la pre-  
sente invención, que proporciona un producto de enzima saca-  
rificadora inmovilizada, en forma de partículas, en el que  
unas partículas de soporte enzimáticamente inerte, insolu-  
ble en agua, son revestidas esencialmente con una capa pro

1 teica, permeable a los líquidos, donde se inmoviliza la enzima sacarificadora por reticulación con glutaraldehido.

5 Los intentos de preparar tales productos insolubilizados donde la capa proteica está compuesta por la enzima sacarificadora reticulada con glutaraldehido por sí misma resultaron no tener éxito, en el sentido de que, independientemente de la elección de material de núcleo, dieron como resultado unos productos incompletamente inmovilizados, de los que se eliminaría rápidamente la enzima por lixiviación. Se encontraron problemas similares con 10 una variedad de materiales de soporte en partículas insolubles en agua, de origen inorgánico (por ejemplo mineral o cerámico), o con ciertos tipos de material de núcleo proteico (tal como proteína de soja granular), es de suponer que debido a un número insuficiente de puntos de enlace de reticulación en la superficie de tales partículas. 15

Sin embargo, se ha hallado ahora que estos y otros obstáculos se pueden superar, y perfeccionar mucho las propiedades físicas y enzimáticas de los productos revestidos de enzima inmovilizada, siempre que se use caseína granular como material de núcleo, y además que la reticulación con glutaraldehido de la enzima en la capa de revestimiento se efectúe en presencia de una proteína aglutinante no enzimática, soluble en agua, tal como albúmina de huevo, 20 constituyendo evidentemente la elección de tales materiales una combinación favorable para crear un número suficiente de reticulaciones interproteicas estabilizadoras de enzima. 25

30 Así, más específicamente, según un aspecto de la presente invención se proporciona un producto de enzima

1    sacarificadora inmovilizada en forma de partículas, sien-  
do elegida dicha enzima sacarificadora del grupo que consta de amiloglucosidasa y alfa-amilasa maltógena, comprendiendo dicho producto partículas de soporte que consisten principalmente en caseína granular, que están esencialmente revestidas con una capa proteica permeable a los líquidos, donde la enzima sacarificadora está correticulada con albúmina de huevo mediante glutaraldehido.

5  
10    Las cantidades relativas de los constituyentes en zima sacarificadora, caseína y albúmina pueden variar dentro de límites bastante amplios, dependiendo, entre otras cosas, de la actividad unitaria (según se define más adelante) del material de partida de enzima sacarificadora soluble. Sin embargo, en una realización preferida de la presente invención la proporción de enzima sacarificadora: caseína está comprendida entre 1:200 y 1:3. preferiblemente 1:20 a 1:5, calculándose la cantidad de enzima sacarificadora en base a un producto que tenga una pureza de al menos 50 por ciento. Análogamente, un intervalo preferido para la relación entre enzima sacarificadora:albúmina de huevo es de 1:5 a 1:0,05, y aún es más preferido el intervalo de 1:2 a 1:0,2.

15  
20  
25    Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un producto de enzima sacarificadora inmovilizada, en forma de partículas, siendo elegida dicha enzima sacarificadora del grupo que consta de amiloglucosidasa y alfa-amilasa maltógena, procedimiento que comprende esencialmente revestir partículas de soporte, consistente principalmente en caseína granular, con una capa proteica en la que la enzima sacarifi-

1 - cadora está reticulada con albúmina de huevo, mediante glutaraldehído.

En más detalle, el presente procedimiento comprende de la etapa de humedecer por agitación vigorosa una mezcla seca de caseína granular y polvo de albúmina de huevo, con  
5 una mezcla acuosa consistente en la enzima sacarificadora y glutaraldehído en disolución a pH 4-7, estando la albúmina opcionalmente disuelta junto con estos constituyentes, en vez de mezclada en estado seco con la caseína; seguido  
10 por la etapa de mantener la mezcla humedecida resultante en reposo, usualmente a temperatura ambiente, para completar el procedimiento combinado de revestimiento del soporte y reticulación de proteína. La mezcla se puede efectuar  
15 manualmente, por ejemplo por mezcla y amasado en un mortero, o mecánicamente, por ejemplo en un mezclador horizontal del tipo de arado que se puede obtener de Gebr. Lödige Maschinenbau G.m.b.H., Paderborn, Alemania Occidental, o un tipo similar de aparato de mezcla industrial.

20 La proporción entre glutaraldehído (usualmente añadido como solución acuosa al 50 por ciento (peso/peso)) y proteínas de la capa de revestimiento (enzima más albúmina) puede variar considerablemente, siendo el intervalo preferido 0,1 a 1. El contenido de agua en la solución  
25 acuosa se ajusta usualmente para que esté comprendido entre 20 y 50 por ciento de la mezcla total.

Las propiedades del producto de caseína granular elegido como material de soporte son significativas para alcanzar los objetos de la presente invención. Así, los  
30 gránulos de caseína deben poseer la estabilidad física suficiente para resistir a deformaciones sustanciales por

1 empapamiento bajo las condiciones de la columna de lecho  
de relleno. Además, el grado de hinchamiento en agua debe  
ser razonablemente bajo, preferiblemente no excediendo de  
200 por ciento, Es ejemplo de un producto que cumple con  
5 tales requisitos la caseína granular precipitada con áci-  
do. Los productos de este tipo de calidad para alimentos,  
preferiblemente teniendo diámetros de partícula compendi-  
dos entre 100 y 500 micras, se pueden obtener de diversas  
fuentes, por ejemplo de la compañía francesa Scerma S.A.  
10 El examen al microscopio electrónico de exploración reve-  
la que la superficie de tales partículas tiene una estruc-  
tura desigual e irregularmente plegada, que se parece algo  
al aspecto macroscópico de la piedra pómez. Es concebible  
que una microestructura superficial de este tipo exponga  
15 gran número de puntos de unión con glutaraldehído.

Para la práctica de la presente invención es esen-  
cial que una fracción sustancial de la albúmina usada como  
proteína aglutinante sea casi instantáneamente soluble en  
agua. Por tanto, la calidad preferida para la albúmina es  
20 un producto secado por pulverización, en general disponi-  
ble.

El procedimiento de mezcla puede implicar un cier-  
to grado de aglomeración de las partículas revestidas, dan-  
do como resultado, una vez completada la reacción de reti-  
25 culación, la formación de un producto húmedo, en gránulos  
gruesos y grumoso. Este producto se puede someter a más  
desintegración, por ejemplo por granulación, para formar  
un producto en partículas con tamaños de partícula dentro  
de un intervalo preferido. La granulación se puede efectuar  
30 en un granulador oscilante del tipo suministrado por varias

1 - compañías (Diaf, Copenhague, o Manosty, Liverpool). El  
producto granulado que pasa por el tamiz del granulador,  
por ejemplo uno con agujeros de 1-2 mm, se puede liberar  
de material fino por medios usuales. El producto así ob-  
tenido se puede lavar opcionalmente, seguido por secado  
5 hasta el contenido de agua deseado.

Antes de usarlo para un procedimiento de sacarifi-  
cación, el producto de enzima seco se acondiciona usual-  
mente por empapamiento previo en una solución acuosa. En  
esta etapa, y también durante la fase inicial del subsi-  
guiente uso del producto, se puede observar una cierta fu-  
ga de actividad enzimática. Se ha hallado que la inclusión  
de una etapa adicional de reticulación, opcionalmente en  
relación con el procedimiento de empapamiento, puede ser-  
vir para reducir sustancialmente esta pérdida de actividad  
enzimática. Por tanto, según una realización preferida de  
la presente invención, el tratamiento previo del producto  
de enzima se efectúa en una solución acuosa que contiene  
una cantidad adecuada, preferiblemente 0,5 a 5 por ciento,  
20 de glutaraldehído, usualmente seguido por eliminación del  
exceso de reactivo por lavado y, opcionalmente, recupera-  
ción del producto seco. Se ha hecho la observación adicio-  
nal de que el tratamiento previo del producto de enzima con  
una sal de ácido sulfuroso puede efectuar un aumento signi-  
25 ficativo del grado de conversión (según se expresa en tan-  
to por ciento de equivalente de dextrosa, o valor ED) del  
producto sacarificado. La acción del sulfito se explica de  
la forma más probable como una "apertura" de ciertas es-  
estructuras reticulares que implican a la capa proteica de  
30 actividad enzimática, pero que aparentemente (y sorpren-

1 dentemente) no afecta a la unión de la enzima, facilitan-  
do así el acceso de los oligosacáridos superiores a los  
puntos de actividad enzimática. Por tanto, otra realiza-  
ción preferida de la presente invención implica tratar el  
producto de enzima con una solución acuosa diluida de sul-  
5 fito, que contenga preferiblemente 0,1-2 por ciento de  
sulfito sódico a pH de aproximadamente 4-5. El tratamien-  
to con sulfito se efectúa preferiblemente a temperatura  
ambiente, y usualmente se termina tras 120 minutos por la  
vado con agua, opcionalmente seguido por recuperación del  
10 producto seco. Se ha observado que tras el tratamiento con  
sulfito no vuelve a aparecer la fuga de enzima.

Los productos de enzima en partículas preparados  
según el método anterior se pueden usar en procedimientos  
de sacarificación de tipo discontinuo, que implican sepa-  
15 ración y nuevo uso del producto de enzima, o en un tipo  
continuo de procedimiento en un reactor de enzimas.

La fuente microbiológica de la enzima sacarifica-  
dora no forma parte de la presente invención. Sin embargo,  
20 se obtiene un producto de amiloglucosidasa comercial pre-  
ferido cultivando cepas que pertenecen a los géneros de  
Aspergillus o Rizopus, p.ej. Aspergillus niger o Rizopus  
delemar. Análogamente, la alfa-amilasa maltógena se obtie-  
ne preferiblemente de cepas de Aspergillus oryzae.

25

#### Determinación de la actividad de amiloglucosidasa

La actividad unitaria de la amiloglucosidasa solu-  
ble, así como la de la enzima inmovilizada, definida como  
30 la cantidad de enzima o producto de enzima que hidroliza

1 a una solución acuosa que contiene 30 por ciento (peso/vol)  
de maltosa, a una velocidad inicial de 1 micromol de mal-  
tosa por minuto, se determina bajo condiciones normaliza-  
das, que son pH 4,5 y temperatura de 55,0°C. La actividad  
5 de la enzima inmovilizada se determina de forma disconti-  
nua en una muestra que se mantiene en suspensión mediante  
un dispositivo de agitación.

Determinación de la actividad de alfa-amilasa fúngica

10

15

20

25

30

La actividad unitaria de la alfa-amilasa fúngica soluble, así como la de la enzima inmovilizada, definida como la cantidad de enzima o producto de enzima que hidroliza a una solución acuosa que contiene almidón soluble (Amylum solubile de Merck, DAB, Erg. B VI) (6,95 g por 1000 ml) a una velocidad inicial de 5,26 mg de almidón por hora, se determina bajo condiciones normalizadas, que son pH 5,6-5,7, temperatura de 37,0°C  $\pm$  0,05°C, y en presencia de ión Ca <sup>++</sup> 4,3 milimolar. Para seguir la reacción se usa la formación de un color azul con yodo. Durante la degradación del almidón este color se hace más débil, y cambia gradualmente a rojo-pardo. El cambio de color se comprueba visualmente por comparación con patrones de vidrio coloreado. La actividad de la enzima inmovilizada se determina bajo condiciones análogas a las indicadas para la amiloglucosidasa.

Se dispone comercialmente de enzimas sacarificadoras solubles. Son ejemplos de tales productos la AMYLOGLIUCOSIDASE NOVO 150 y FUNGAMYL 1600 (FUNGAMYL es marca registrada). La primera, que se vende como solución acuosa,

1 se convierte usualmente en polvo secado por pulverización  
antes de ser usada para el fin de la presente invención.  
Opcionalmente, el procedimiento de secado puede estar pre  
cedido por ultrafiltración, usualmente combinada con un  
5 procedimiento de lavado con el objeto de eliminar contami  
nantes de bajo peso molecular. Usando tales procedimientos  
de concentración y purificación, todos bien conocidos por  
los expertos en la técnica, se puede obtener fácilmente  
un producto de amiloglucosidasa sólida con actividad de  
10 5000 unidades por gramo, o más.

El FUNGAMYL 1600, que se vende en forma de polvo,  
tiene una actividad de 1600 unidades por gramo. El produc  
to comercial como tal puede servir como material de parti  
da satisfactorio. Sin embargo, si se desea, se pueden in  
15 terponer métodos de purificación y concentración, por ejem  
plo de los tipos antes mencionados.

La recuperación global de actividad en el producto  
de enzima sacarificadora insolubilizada es función de los  
parámetros detallados del procedimiento de inmovilización,  
20 pero usualmente no es menor que 40 por ciento, y frecuente  
mente es mayor.

El sustrato del procedimiento de sacarificación  
efectuado mediante un producto de enzima inmovilizada se  
25 gún la invención puede ser cualquier oligosacárido que ex  
perimente sacarificación en presencia de la correspondiente  
enzima soluble. Son ejemplos de sustratos preferidos las  
dextrinas obtenidas por licuación de almidón con ácido y/o  
enzima, y que tienen valores ED comprendidos entre 5 y 40;  
30 jarabes con mucha maltosa (valores ED de 35 a 60); y oligo  
sacáridos residuales presentes en las aguas madres de cris

1 talización de dextrosa o en refinados obtenidos de frac-  
cionamiento de fructosa-glucosa. Se prefieren las solu-  
ciones de dextrina que tienen un contenido de sólidos se-  
cos comprendido entre 20 y 55 por ciento (peso/vol).

5 Los siguientes ejemplos ilustran más la presente  
invención.

#### EJEMPLO 1

10 Una calidad relativamente gruesa de caseína granu-  
lar precipitada con ácido clorhídrico (9 g de "caseína ali-  
menticia" (Scerma S.A., Francia), consistente en partícu-  
las de 100-500 micras, constituyendo la fracción de 300-  
-500 micras aproximadamente 60 por ciento) se mezcló con  
15 albúmina de huevo comercial, secada por pulverización  
(1,2 g). A esta mezcla se añadió una solución previamen-  
te mezclada de polvo de amiloglucosidasa (6,5 ml de solu-  
ción acuosa al 18,5 por ciento (peso/vol) que contenía un  
total de 12.500 unidades de amiloglucosidasa) y glutaral-  
20 dehidro (1,2 ml de solución acuosa al 50 por ciento (peso/  
/peso)). El polvo de amiloglucosidasa era un producto se-  
cado por pulverización, ultrafiltrado, preparado con AMYLO  
GLUCOSIDASE NOVO (NOVO INDUSTRI A/S, Dinamarca). La mez-  
cla se amasó cuidadosamente en un mortero, y luego se de-  
25 jó reposar a temperatura ambiente durante una hora. El  
agregado resultante se desintegró en mortero, formando un  
producto granular que se dejó secar a temperatura ambiente  
durante un día.

30 El producto granular secado (11,4 g) tenía una ac-  
tividad de 425 unidades por g, representando así una recu-  
peración de 38,8 por ciento tras inmovilización.

1

EJEMPLO 2

5

Una caseína granular precipitada con ácido (1500 g del tipo M60 (Scerma S.A.) consistente en partículas de 100-500 micras, constituyendo la fracción de 150-350 micras aproximadamente 70 por ciento) se mezcló en estado seco con albúmina comercial secada por pulverización (120 g), en un mezclador horizontal tipo arado, de 20 litros (Gebr. Lödige Maschinenbau, G.m.b.H., Alemania Occidental).

10

15

20

25

Un concentrado ultrafiltrado de amiloglucosidasa, preparado con AMYLOGLUCOSIDASE NOVO (650 g de una solución que tenía un contenido de materia seca de aproximadamente 25 por ciento, y que contenía aprox. 3200 unidades de amiloglucosidasa soluble por g de concentrado) se mezcló convenientemente con glutaraldehído (180 ml de una solución acuosa al 50 por ciento (peso/peso) a pH 4,9 y temperatura de 18°C, tras lo cual la solución resultante se vertió en el aparato de mezcla. Se continuó la agitación vigorosa durante 0,5 a 1 minuto adicional, seguida por retirada del mezclador del producto humedecido en partículas. El producto húmedo se dejó en reposo durante aproximadamente 45 minutos para completar el procedimiento de reticulación, con lo que se formaron grumos de partículas agregadas. La granulación del producto se efectuó en un granulador oscilante (por ejemplo del tipo suministrado por Diaf A/S, Copenhagen) provisto de un tamiz de 1,5 mm de diámetro.

30

El granulado se lavó con agua desionizada (10 l) durante 10 minutos, se recuperó por filtración y luego se sometió a secado en lecho fluido. El producto seco (1600 g, 450 unidades de amiloglucosidasa por g) se liberó de

1 finos por tamizado.

### EJEMPLO 3

5 Una solución de polvo de amiloglucosidasa secado por pulverización (105 g, actividad 11.400 unidades por g, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1) y albúmina secada por pulverización (105 g) se preparó en agua del grifo (400 ml) y se dejó durante la noche en el refrigerador a 6-7°C. El pH de la solución era 5,4.

10 Luego se añadió glutaraldehído (100 ml de solución acuosa al 50 por ciento (peso/peso)), y la solución resultante se transfirió en el curso de 3 minutos a una tanda vigorosamente agitada de caseína granular precipitada con ácido clorhídrico (725 g de la misma calidad que la usada en el Ejemplo 1). La mezcla se efectuó en un mezclador industrial del mismo tipo que el del Ejemplo 2. La agitación vigorosa de la mezcla de reacción se continuó durante unos pocos minutos adicionales, tras lo cual se dejó en reposo hasta que se completó la reacción de reticulación, tras 20 aproximadamente 1 hora. El producto agregado y grumoso resultante se granuló en un granulador oscilante, a través de un tamiz de 2 mm de diámetro.

25 El granulado se lavó con una solución acuosa de acetato sódico (pH 4,2), seguido por secado bajo vacío a 35°C.

30 El producto granulado seco (925 g) tenía una actividad de 800 unidades por g, lo que representa una recuperación del 67,8 por ciento tras inmovilización.

1

EJEMPLO 4

5

El producto de amiloglucosidasa inmovilizada preparado según el Ejemplo 3 (20 g) se empapó durante una hora a temperatura ambiente, en una solución acuosa de glutaraldehído (500 ml de solución al 1 por ciento ajustada a pH 7), seguido por recuperación del producto seco (20 g).

10

La actividad de este producto era 625 unidades por g, representando así una recuperación de 78 por ciento en la segunda etapa de inmovilización, y una recuperación global de 53 por ciento de amiloglucosidasa soluble.

15

EJEMPLO 5

20

Una solución acuosa de alfa-amilasa maltógena (2 ml de solución al 5 por ciento (peso/vol) de FUNGAMYL 1600 (NOVO INDUSTRI A/S, Dinamarca) en agua desionizada a pH 6,2) se mezcló con una solución acuosa de glutaraldehído (0,3 ml de solución al 50 por ciento (peso/peso)) y luego se añadió rápidamente a una mezcla seca de caseína granular precipitada con ácido (4,0 g del tipo M60) y albúmina de huevo comercial secada por pulverización (0,5 g). Tras amasado concienzudo del producto resultante en un mortero, se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los grumos se desintegraron en mortero, tras lo cual se dejó secar el producto a temperatura ambiente durante 1 día.

25

30

EJEMPLO 6

Una columna encamisada de 15 mm de diámetro interior, mantenida a 55°C, se cargó con el producto de amilo-

1 — glucosidasa inmovilizada (5,7 g) preparado según el Ejemplo 1.

5 Una alimentación en flujo descendente, consistente en una dextrina comercial al 30 por ciento (peso/vol), hidrolizada con ácido/enzima (maltodextrina CPC Snow Flake 01915, de ED 20), que tenía la siguiente composición aproximada:

	Tanto por ciento
10 glucosa (DP ) :	4-5
1 disacáridos (DP ):	8-9
2 trisacáridos (DP ):	6-7
3 tetra- y oligosacáridos (DP +):	79-82
4	

15 a la que se añadió 0,2 por ciento (peso/vol) de sulfito sódico, seguido por ajuste del pH a 4,5, se aplicó a la columna a caudal constante de 15 ml por hora.

20 El efluente se analizó por cromatografía de líquido a alta presión (CLAP), dando los siguientes resultados:

25

30

35

Días	Tanto por ciento DP <sub>1</sub>	Tanto por ciento DP <sub>2</sub>	Tanto por ciento DP <sub>3</sub>	Tanto por ciento DP <sub>4</sub>	ED calculado	
1	92,0	5,6	0,7	1,7	95,3	
5	4	93,2	4,2	0,6	2,0	95,8
5	92,9	3,9	0,7	2,5	95,4	
7	93,6	3,2	0,6	2,5	95,8	
10	9	93,3	3,1	0,7	2,9	95,5
11	92,6	3,2	0,8	3,3	94,9	
13	92,6	2,9	0,9	3,6	94,9	

15

EJEMPLO 7

Una columna encamisada de 25 mm de diámetro interior, mantenida a 55°C, se cargó con el producto de amiloglucosidasa inmovilizada (20 g) preparado según el Ejemplo 2.

20

Una alimentación de sustrato en flujo ascendente, que tenía la misma concentración, composición y pH que la usada en el Ejemplo 6, se aplicó a la columna a caudal constante de 50 ml por hora. El contenido de glucosa (tanto por ciento DP<sub>1</sub>) se analizó por el método de la hexoquinasa, dando los siguientes resultados:

25

30

1		
	Días	Tanto por ciento DP <sub>1</sub>
	1	89,0
	4	93,6
5	6	93,6
	8	93,1

10

EJEMPLO 8

15

Una columna encamisada de 25 mm de diámetro interior, mantenida a 55°C, se cargó con el producto de amiloglucosidasa inmovilizada (25 g) preparado según el Ejemplo 2. Se aplicó a la columna una alimentación de sustrato en flujo ascendente, de la misma composición que la usada en el Ejemplo 6. La alimentación (pH 4,5) tenía un contenido de sólidos secos de 30 por ciento (peso/peso), y se añadió sorbato potásico (2 g por litro) como conservador. El caudal se ajustó de manera que se mantuviese un grado de conversión aproximadamente constante.

20

El efluente se analizó mediante CIAP, dando la siguiente conversión a glucosa (DP<sub>1</sub>) con el tiempo:

25

30

1

Días	Tanto por ciento DP <sub>1</sub>	Caudal, ml/hora
1	92,6	115
2	-	112
5		
3	92,4	101
4	92,0	82
5	92,2	75
10		
6	92,3	70
7	92,1	66
8	92,6	64
15		
9	-	60
10	92,0	57

20 Una vez completada la experiencia no se observaron cambios en la dureza ni demás propiedades físicas del material de la columna.

#### EJEMPLO 9

25 Usando el método del Ejemplo 7, pero sustituyendo el producto de amiloglucosidasa inmovilizada del Ejemplo 2 por el preparado según el Ejemplo 4, se obtuvieron los siguientes resultados:

30

Días	Tanto por ciento DP <sub>1</sub>
1	90,3
2	92,9
4	93,7
13	93,3

10

EJEMPLO 10

15

20

La alfa-amilasa maltógena inmovilizada preparada según el método del Ejemplo 5 (4 g) se usó como relleno en una columna encamisada mantenida a 45°C, y se aplicó una alimentación en flujo descendente de dextrina comercial (maltodextrina CPC Snow Flake 01913) que contenía 30 por ciento (peso/vol) de sólidos secos, y sulfito sódico (0,2 por ciento) como conservador. El pH de la alimentación se ajustó a 4,5, y el caudal a 15 ml por hora. La tabla siguiente muestra la composición del efluente de la columna, representando DP<sub>2</sub> principalmente el contenido de maltosa:

25

30

1

Días	Tanto por ciento DP <sub>1</sub>	Tanto por ciento DP <sub>2</sub>	Tanto por ciento DP <sub>3</sub>	Tanto por ciento DP <sub>4</sub> <sup>+</sup>	ED calcula- do	
1	5,3	45,4	21,0	28,3	42,5	
5	2	5,0	44,9	21,6	28,5	42,1
	3	4,7	44,1	22,0	29,2	41,7
	4	4,4	43,5	22,7	29,4	41,2

10

EJEMPLO 11A.

Una columna encamisada de 15 mm de diámetro interior, mantenida a 55°C, se cargó con amiloglucosidasa inmovilizada (12 g) preparada según el método del Ejemplo 2.

15

Se aplicó a la columna una alimentación en flujo descendente de dextrina (31 por ciento (peso/vol) basado en el contenido de materia seca), preparada por licuación de almidón con TERMAMYL<sup>®</sup> L60 (NOVO INDUSTRI A/S, Dinamarca), y que tenía la siguiente composición:

20

	Tanto por ciento
glucosa (DP <sub>1</sub> ):	1
disacáridos (DP <sub>2</sub> ):	7-8
trisacáridos (DP <sub>3</sub> ):	10-12
tetra- y oligosacáridos (DP <sub>4</sub> <sup>+</sup> ):	79-82
ED	21

25

La alimentación contenía sulfito sódico (0,2 por ciento (peso/vol)) como conservador, y tenía un pH de 4,5. El flujo se reguló para mantener un grado constante de con

30

1 versión (en términos de tanto por ciento DP<sub>1</sub>). El efluente se analizó por CIAP, dando los siguientes resultados:

5	Días	Tanto por ciento DP <sub>1</sub>	Tanto por ciento DP <sub>2</sub>	Tanto por ciento DP <sub>3</sub>	Tanto por ciento DP <sub>4+</sub>	Caudal, ml/hora
	3	92,1	4,2	0,7	3,1	35
	7	92,3	3,6	0,8	3,3	33
10	14	92,2	3,6	0,7	3,5	27
	28	92,4	3,1	0,9	3,6	18
	56	92,1	3,3	0,8	3,7	15

15 B.

Un sustrato de dextrina preparado según el método descrito en (A), y que tenía la siguiente composición:

	Tanto por ciento
20 glucosa (DP <sub>1</sub> ):	1,1
disacáridos (DP <sub>2</sub> ):	6,8
trisacáridos (DP <sub>3</sub> ):	11,0
tetra- y oligosacáridos (DP <sub>4+</sub> ):	81,0

25 se trató con 0,01 por ciento (basado en sólidos secos totales) de alfa-amilasa maltógena (FUNGAMYL 1600, NOVO INDUSTRIA/S), a pH 5,0 y 50°C durante dos horas. Tras el tratamiento, el sustrato tenía la siguiente composición:

30

1	Tanto por ciento
	glucosa (DP <sub>1</sub> ): 1,3
	disacáridos (DP <sub>2</sub> ): 13,9
	trisacáridos (DP <sub>3</sub> ): 22,3
	tetra- y oligosacáridos (DP <sub>4</sub> ): 62,5

5 Cada una de dos columnas encamisadas de 15 mm de diámetro interior, mantenidas a 55°C, se cargaron con amiloglucosidasa inmovilizada (10 g, preparada según el Ejemplo 2). Se aplicaron a las columnas alimentaciones en flujo descendente, consistentes en 30 por ciento (peso/vol) de los dos tipos de dextrina preparados como se ha descrito antes, a los que se añadió 0,2 por ciento (peso/vol) de sorbato potásico, seguido por ajuste del pH a 4,5. Se obtuvieron los siguientes resultados:

15

Alimentación	Dextrina	
	antes del tratamiento con FUNGAMYL	después del tratamiento con FUNGAMYL
Máximo valor DX del efluente, tanto por ciento	92,7	93,3

20

EJEMPLO 12

25

Unas porciones (10 g) de amiloglucosidasa inmovilizada, preparada según el método del Ejemplo 2, se empaparon en soluciones de 100 ml que contenían diferentes concentraciones de sulfito sódico. El pH de la solución se ajustó a 4,5 por adición de ácido acético. Tras empapar durante 2 horas a temperatura ambiente, las muestras de enzi

30

1 ma se lavaron con agua desionizada y se usaron como relleno en columnas encamisadas de 15 mm de diámetro interior, mantenidas a 55°C.

5 Se aplicaron a las columnas alimentaciones en flujo descendente consistentes en dextrina (30 por ciento (peso/vol)), preparada según el método del Ejemplo 11 A, a la que se añadió sorbato potásico (0,2 por ciento (peso/vol)), seguido por ajuste del pH a 4,5.

10 Ajustando el caudal de cada columna para dar el máximo valor DX del efluente, se obtuvieron los siguientes resultados:

	Sulfito sódico, g/100 ml	0,0	0,01	0,1	0,2	0,5	1,0
15	Máximo DX	90,3	90,2	91,2	91,7	91,9	92,4

### EJEMPLO 13

20 El efluente con mucha maltosa (ED aproximadamente 42) recogido de la columna de FUNGAMYL inmovilizada del Ejemplo 10 se usó como alimentación para la columna de amiloglucosidasa inmovilizada del Ejemplo 6. El caudal se ajustó (a 73 ml por hora) para producir un efluente que tenía la siguiente composición de un jarabe de alta conversión (ED aproximadamente 65):

	Tanto por ciento
25 glucosa (DP <sub>1</sub> ):	38,1
disacáridos (DP <sub>2</sub> ):	39,6
30 trisacáridos (DP <sub>3</sub> ):	2,8
tetra- y oligosacáridos (DP <sub>4+</sub> ):	19,6

1

EJEMPLO 14

Una columna encamisada de 25 mm de diámetro interior, mantenida a 55°C, se cargó con producto de amiloglucosidasa inmovilizada (20 g) preparado según el Ejemplo 3.

5

Una alimentación de sustrato en flujo ascendente, consistente en las aguas madres (o refinado) obtenidas de fraccionamiento de fructosa-glucosa, y que tenía la siguiente composición:

	Tanto por ciento
10 fructosa	3,25
glucosa	85,71
disacáridos	9,17
trisacáridos	1,42
sacáridos superiores	0,54

15

y con pH ajustado a 4,5, se aplicó a la columna en caudal de 250 ml por hora, a una concentración de 25 por ciento (peso/peso). Se mostró que la composición del efluente, de terminada por CLAP, era:

20

	Tanto por ciento
20 fructosa	3,25
glucosa	91,16
disacáridos	4,14
trisacáridos	1,15
25 sacáridos superiores	0,30

30

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presenten 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:

1ª.- Un procedimiento para la preparación de un producto de enzima sacarificante inmovilizada en forma de partículas, seleccionándose la enzima sacarificante del grupo que consta de amiloglicosidasa y alfa-amilasa maltógena, cuyo procedimiento comprende revestir partículas de soporte de caseína granular con una mezcla de reacción acuosa de enzima sacarificante, albúmina de huevo y glutaraldehído, en donde las proporciones en peso de la cantidad de enzima sacarificante a caseína y a albúmina se encuentran en el intervalo de 0,005 a 0,5 y de 0,2 a 20, respectivamente, la proporción en peso de glutaraldehído a enzima sacarificante y albúmina de dicha mezcla de reacción se halla en el intervalo de 0,1 a 1 y el contenido de agua de dicha mezcla de reacción acuosa está comprendido dentro del intervalo de 20 a 50 por ciento (peso/peso), con lo que la caseína granular queda revestida por una capa proteica permeable a los líquidos en la que la enzima sacarificante y la albúmina de huevo están reticuladas por reacción con el glutaraldehído.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que las proporciones en peso de la cantidad de enzima sacarificante a caseína y a albúmina están comprendidas dentro del intervalo de 0,04 a 0,2 y de 0,5 a 5, respectivamente.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,

1 en el que el diámetro de las partículas de soporte está comprendido  
entre 100 y 500 micras.

5 4ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que el producto de enzima sacarificante inmovilizada se trata previamente en una solución diluida de glutaraldehído.

10 5ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que el producto de enzima sacarificante inmovilizada se trata previamente en una solución diluida de una sal de ácido sulfuroso.

6ª.- Un procedimiento para la preparación de un producto de enzima sacarificante inmovilizada en forma de partículas.

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

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

MADRID, 01 JUN 1978

P.A.

Fernando de Elzaburu  
Por Poder.

