MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

6 NOV. 1978

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

(19) ES (11) (21) NUMERO 461.346 (10) A1

(22) FECHA DE PRESENTACION 4-8-1977

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:

(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
712.102	5-8-76	EE.UU.
712.103	5-8-76	"

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D; C07G	

(54) TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA INACTIVACION SELECTIVA DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMA PROTEOLITICA EN UNA PREPARACION DE ENZIMA DE α-AMILASA BACTERIANA"

(71) SOLICITANTE (S)

CPC INTERNATIONAL, INC. (PP/6941)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

International Plaza, Englewood Cliffs, Nueva Jersey 07632, Estados Unidos de América

(72) INVENTOR (ES)

Harry W. Leach, Henry H. Nonaka y Ronald E. Hebeda

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P-66.672)

Este invento se refiere a la inactivación selectiva de una enzima en presencia de otra, y más en particular se refiere a la inactivación selectiva de la actividad enzimática proteolítica que existe junto con la actividad de alfa-amilasa en preparados o preparaciones bacterianos brutos de la enzima alfa-amilasa.

La alfa-amilasa es un preparado de enzima que se emplea para digerir o licuar materiales de almidón tales como la etapa inicial en la producción de cierto número de edulcorantes tales como dextrosa, levulosa, maltosa, y jarabes de maíz de elevado E.D. (equivalente de dextrosa) La alfa-amilasa hidroliza las moléculas de almidón para romperlas en una variedad de fragmentos de peso molecular inferior. Estos productos se tratan subsiguientemente con uno o más preparados de enzima adicionales, incluyendo glucoamilasa, beta-amilasa y glucosa-isomerasa con el fin de obtener el producto final deseado. Alternativamente, una pluralidad de estos preparados enzimáticos pueden introducirse en una suspensión del material de almidón simultáneamente para producir directamente los materiales edulcorantes.

Los preparados de la enzima alfa-amilasa son asequibles de una amplia variedad de fuentes. Es económica y más comercialmente factible emplear alfa-amilasas que se producen a partir de fuentes bacterianas. Ciertos organismos bacterianos, tales como el Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, etc., se cultivan en tinas grandes destruyéndose a continuación las células y el preparado enzimático se separa del caldo y se purifica. Sin embargo, este preparado de enzima alfa-amilasa "purificado" toda-

vía retiene ciertas impurezas que son difíciles y costosas de eliminar.

Una de tales impurezas perjudiciales es conocida como proteasa o enzima proteolítica. Este material biológicamente activo puede reaccionar con diversos materiales proteínicos presentes en los materiales de almidón produciendo hidrolizados que contienen péptidos, polipéptidos y aminoácidos.

La presencia del contaminante enzima proteasa en la alfa-amilasa es perjudicial en la hidrólisis del material que contiene almidón. En general, diferentes tipos de materiales de almidón contendrán cantidades diferentes de materiales proteínicos. Por ejemplo, un material de almidón de maíz refinado puede contener tan poco como 0,3% de proteínas; un producto molido y seco, tal como sémolas de maíz puede contener hasta aproximadamente 8 a 10% de proteínas y materiales de almidón no refinados denominados almidones de molinos, pueden contener tanto como 20% de materiales proteínicos. Cuando el material de almidón se hidroliza empleando el preparado de enzima alfa-amilasa, la presencia de actividad de proteasa en el preparado hace que una fracción del material proteínico sea hidrolizada simultáneamente con el almidón. Esto da como resultado la pérdida de productos proteínicos económicamente valiosos. Además, estos sub-productos indeseables tienen que ser eliminados del producto edulcorante final con un coste extra.

Económicamente es deseable utilizar el material de partida menos costoso posible para obtener los hidrolizados de almidón. Por consiguiente, un almidón de

molino, que solo ha experimentado la separación de la fibra y el embrión es preferible a un almidón refinado que tiene un bajo contenido de proteínas. Cuando se utiliza un preparado de la enzima alfa-amilasa que incluye cantidades sustanciales de actividad de proteasa, es necesario emplear materiales de almidón refinados relativamente costosos debido a sus bajos contenidos de proteína. El empleo de tales preparados de enzima sobre los materiales de almidón menos refinados produciría excesos de materiales de hidrolizados de proteína que interferirían con los empleos subsiguientes y las conversiones del hidrolizado de almidón.

Si el preparado de la enzima alfa-amilasa está sustancialmente exento de actividad de enzima proteolítica, las proteínas contenidas en el material de almidón que se hidroliza no serán hidrolizadas en ningún grado apreciable, sino que permanecerán en el material insoluble y pueden filtrarse y recuperarse de un modo eficaz.

No es esencial que la totalidad de la actividad de enzima proteolítica sea eliminada o inactivada en el preparado de la enzima alfa-amilasa. Aunque es preferible que esta actividad proteolítica sea reducida a un nivel tan bajo como sea posible, se ha encontrado que si la relación de actividad de enzima proteolítica, U/g, a actividad de enzima amilolítica, U/g, (la relación P/α) es menor de aproximadamente 2, el preparado de enzima funcionará de un modo satisfactorio para los fines de este invento. Es más preferido que esta relación sea menor de aproximadamente 0,8. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión alfa-amilasa exenta de proteasa

significará un preparado de enzima alfa-amilasa en el que esta relación es menor de aproximadamente 2.

Las alfa-amilasas exentas de proteasa de este invento son útiles para la producción de hidrolizados de almidón a partir de una variedad de materiales de almidón. Estos materiales pueden derivar de cualquier fuente tal como maíz, trigo, arroz, patata y sorgo en grano. Pueden emplearse variedad céreas. En los Estados Unidos, los materiales de almidón derivados del maíz se prefieren generalmente por razones económicas, mientras que los materiales de almidón derivados del trigo y del arroz se prefieren en otras partes del mundo.

El material de almidón puede ser cualquiera de una variedad de productos parcialmente purificados; es decir, materiales secos, un ejemplo de los cuales es las sémolas de maíz (otros incluyen mondas de maíz, harina de maíz, harina de trigo, etc), o productos húmedos tales como almidón de molino y productos más refinados a partir de los cuales ha sido separada una parte del gluten. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "almidón de molino" se emplea para significar cualquiera de las diversas suspensiones de almidón parcialmente purificadas variando desde un producto muy bruto desde el cual solamente han sido eliminados las fibras y el germen hasta un material purificado que contiene menos de aproximadamente 0,3% de materiales proteínicos. Almidón de molino "ligero" se refiere a una suspensión de almidón tal como se recibe de los separadores de fibra y de germen, mientras que almidón de molino "pesado" se refiere a un material similar a partir del cual se ha eliminado

una parte del agua. Los almidones puros también pueden emplearse.

Las alfa-amilasas exentas de proteasa de este invento son útiles para formar hidrolizados de almidón por los métodos usuales. Particularmente están adaptadas para emplearse en procedimientos en los que el almidón sin convertir residual permanece en su forma granular. Estos procedimientos están descritos generalmente y reivindicados en las patentes de los Estados Unidos 3.922.196; 3.992.197; 3.922.198; 3.922.199; 3.922,200 y 3.922.201 expedidas todas el 25 de Noviembre de 1975 y cuyos contenidos se incorporan en la presente como con anterioridad.

En los procedimientos del almidón granular, al menos la solubilización inicial del material de almidón se efectúa a una temperatura relativamente baja; es decir inferior a la temperatura de gelatinización real del almidón particular contenido en el material de almidón. A estas temperaturas, la actividad de proteasa representa un problema particular dado que está inactivada en ninguna extensión sustancial. Cuando se emplean procedimientos convencionales que utilizan temperaturas superiores, las enzimas proteolíticas serán inactivadas en una extensión parcial durante el empleo.

Se han sugerido cierto número de procedimientos en la técnica anterior para separar, reducir o inactivar las impurezas de enzima proteolítica o de otro tipo en alfa-amilasa y otros preparados de enzima.

Por ejemplo, la patente de Estados Unidos 3.249.512 sugiere la inactivación de enzimas licuantes

en un preparado de aminoglucosidasa calentando hasta aproximadamente 100ºC; la patente de Estados Unidos 2.683.682 describe la inactivación diferencial de mezclas de alfa-amilasa y proteinasa ajustando el pH de la mezcla y calentando para inactivar selectivamente una de las enzimas; la patente de Estados Unidos 3.912.590 sugiere que la proteasa en una alfa-amilasa derivada del Bacillus licheniformis puede inactivarse durante la licuación del almidón llevando a cabo al menos la parte inicial del procedimiento a una temperatura de 100ºC a 115ºC; la patente de Estados Unidos 3.303.102 sugiere el empleo de un hidrolizado de almidón para tamponar un preparado de amilasa fúngica de la inactivación durante la inactivación ácida de la transglucosidasa. Además, la memoria de la patente japonesa 16.696/62 describe que las soluciones de enzimas proteolíticas pueden estabilizarse mediante una combinación de alcoholes polivalentes y sales de calcio.

Se ha encontrado que el preparado de enzima alfa-amilasa bacteriana bruto puede tener la actividad de proteasa reducida calentando el preparado bruto a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo predeterminado con el fin de inactivar la proteasa. Antes de este tratamiento térmico, el preparado de enzima alfa-amilasa bacteriana bruto se mezcla con un material que es capaz de proteger la alfa-amilasa de la inactivación térmica. Un material protector preferido es un material sustrato de hidrato de carbono tal como jarabe de maíz. Alternativamente, como otra realización preferida, los preparados de alfa-amilasa derivados del Baci

llus licheniformis, que son particularmente estables al calor, pueden tener la actividad proteolítica reducida mediante un tratamiento térmico similar, pero empleando ion calcio como material protector.

Por inactivación de los preparados de enzima, se quiere decir la reducción de la actividad definida de la enzima proteasa a menos de la relación antes definida. La actividad de alfa-amilasa del preparado de enzima se determina de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente de Estados Unidos 3.922.199 expedida el 25 de Noviembre de 1975.

Una unidad de actividad de enzima proteasa se define por la cantidad de enzima que produce fragmentos solubles en ácido tricloroacético que dan un colorazul equivalente a 0,5 µg de tirosina bajo el siguiente método de ensayo.

Una solución de caseína patrón se prepara disolviendo 2,00 g de caseína en 20,0 ml de NaOH 1,0 N. Se añaden 50 ml de agua y se ajusta el pH a 6,3 con ácido fosfórico diluído (1 parte de ácido al 85% para tres partes de agua, V/V). Se añade agua hasta 100 ml.

Una solución de reserva de tirosina se prepara disolviendo 250,0 mg de l-tirosina en HCl 0,2 N para preparar 500 ml de solución. Esta solución contiene 500 µg de tirosina por ml.

Se prepara una solución de reactivo de Folin-fenol diluyendo 100 ml de reactivo de fenol (Folin 2N y Ciocalteau, Fisher Scientific Co.) con 300 ml de agua.

Se prepara una curva patrón como sigue.

Se pipetean 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 y 6,0 ml

de la solución de tirosina de reserva en cada uno de seis matraces volumétricos de 50 ml y se diluyen hasta la marca con HCl 0,2 N. Las soluciones resultantes contienen 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg de tirosina/ml. Se pipetean 3,0 ml de cada solución en un tubo de ensayo de 25 x 150 mm. Se prepara una muestra en blanco que contiene 3,0 ml de HCl 0,2 N. Se pipetean 15,0 ml de Na_2CO_3 0,4 M y 3,0 ml de reactivo Folin-fenol en cada tubo de ensayo y se mezclan con un mezclador Vortex. Se coloca en un baño de agua a 37ºC durante 20 minutos para desarrollar color. Se determina la absorbancia de cada muestra con respecto al agua destilada en una cubeta de 1 cm a 660 nm. Se resta de la absorbancia de cada muestra la absorbancia de la muestra en blanco y se representa gráficamente la absorbancia corregida frente a los µg de tirosina por ml. Los valores de la absorbancia deben estar en el intervalo de 0,10 a 0,60.

El método de ensayo de la proteasa es como sigue.

Se prepara una solución de enzima que contiene 20-100 U/ml de proteasa añadiendo un peso conocido de un preparado de enzima a un matraz volumétrico de 500 ml y diluyendo hasta la marca con una solución de acetato de calcio al 0,1% en peso/volumen. Se pipetean 1,0 ml de la solución de enzima en cada uno de los dos tubos de centrífuga de 15 ml en un baño de agua de temperatura constante de 37ºC (se emplea un tubo para cada muestra, otro para una muestra en blanco). Se deja que se equilibren durante 5 minutos. Empleando pipetas de soplado se añaden 1,0 ml de solución de caseína a la muestra y 2,0 ml de

ácido tricloroacético 0,4 M a la muestra en blanco y se mezclan empleando un mezclador Vortex. Después de un tiempo de reacción de exactamente 10 minutos, se pipetean 2,0 ml de ácido tricloroacético 0,4 M en la muestra y 1,0 ml de solución de caseína en la muestra en blanco.

Se mezcla cada muestra como antes y se continúa la incubación a 37ºC durante 20 minutos más. Se separan las muestras del baño e inmediatamente se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos. Se decanta cada líquido sobrenadante en un tubo de ensayo de 25 x 150 mm y se mezcla exhaustivamente. Se pipetean 2,0 ml de cada líquido sobrenadante en un tubo de ensayo de 25 x 150 mm. Se pipetean 10,0 ml de Na_2CO_3 0,4 M y 2,0 ml de reactivo de Folin-fenol en cada tubo de ensayo y se mezclan. Se colocan los tubos de ensayo en un baño de agua a 37ºC y se incuban durante exactamente 20 minutos para desarrollar color. Se determina la absorbancia relativa al agua destilada en una cubeta de 1 cm a 660 nm. Se resta de la absorbancia de la muestra la absorbancia de la muestra en blanco para obtener la absorbancia neta y se determina la concentración aparente de tirosina de la curva patrón. La actividad de proteasa es entonces la Actividad de proteasa, Ug/ = tirosina aparente en µg/ml x 2 x factor de dilución de 2.

De acuerdo con la primera realización de este invento, puede emplearse cualquier alfa-amilasa bacteriana. Estos preparados se derivan de una amplia variedad de materiales. Estos son materiales comerciales típicos que se venden bajo una variedad de marcas registradas. Particularmente preferidos en la práctica de este invento son

los preparados de enzima alfa-amilasa que tienen una estabilidad térmica relativamente alta, tal como los preparados vendidos bajo la marca registrada THERMAMYL, fabricado por Novo Terapeuitsk Laboratorium, Copenhague, Dinamarca. Estos preparados de enzima se derivan de ciertas cepas de Bacillus licheniformis como se describe generalmente en la patente británica 1.296.839 y tienen una estabilidad térmica relativamente elevada. Otros preparados de enzima útiles son aquellos que se derivan del Bacillus subtilis, tales como los vendidos bajo las marcas registradas RAPIDASE y TENASE.

El preparado de enzima alfa-amilasa bacteriano se mezcla primeramente con un material protector. Los materiales protectores adecuados en general son materiales a base de hidratos de carbono que son capaces de reducir la degradación térmica de la actividad de enzima alfa-amilasa en el preparado. Estos mismos materiales protectores no proporcionan en general protección para la actividad de enzima proteolítica en la misma extensión que la alfa-amilasa. Generalmente los materiales protectores que se prefieren en la práctica de este invento son materiales que son capaces de ser atacados por la alfa-amilasa y por tanto capaces de proteger el sitio activo; por ejemplo, los materiales de hidrolizado de almidón que tienen un E.D. en el intervalo de hasta aproximadamente 50; por ejemplo, un producto sólido de cereal hidrolizado de E.D. 9-11, (por ejemplo, una maltodextrina) vendida bajo la marca registrada de MOR-REX por CPC International Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, o un jarabe de maíz de E.D. 42, también vendido por CPC Internatio-

nal Inc. La dextrosa puede también emplearse como material protector con alguna reducción en la eficacia. Similarmente, si el hidrolizado de almidón tiene un E.D. de sustancialmente por encima de 50, la cantidad de acción protectora será reducida. Estos materiales protectores, cuando están presentes en una base de volumen en el intervalo de aproximadamente 2: 1 a aproximadamente 1:2, de material protector a enzima, reducen sustancialmente el grado de inactivación térmica de la actividad de alfa-amilasa. La base en volumen se basa en emplear un material protector de un 30% de sustancia seca con el preparado de enzima. Como los preparados de enzima comerciales son generalmente de aproximadamente 30% de sustancia seca, las relaciones en volumen son sustancialmente las mismas que las relaciones en peso (de sustancia seca). Generalmente, una cantidad preferida de los materiales hidrolizados será de aproximadamente 70% en base seca.

El material hidrolizado se mezcla en el preparado de enzima alfa-amilasa bacteriana crudo y luego la mezcla se calienta a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70ºC a aproximadamente 90ºC durante un período de tiempo que es suficiente para inactivar la actividad de enzima proteolítica sin reducir sustancialmente la actividad de enzima alfa-amilasa. Generalmente se prefiere una temperatura de aproximadamente 80ºC. El tiempo durante el cual la temperatura se mantiene dependerá del grado de reducción de actividad de enzima proteolítica necesario y la temperatura particular utilizada. Generalmente, son suficientes períodos de 15 minutos a 60 minutos aunque pueden emplearse períodos de hasta 3 horas.

En general, los preparados de enzima derivados del Bacillus subtilis requieren tiempos de calentamiento más corto que los derivados del Bacillus licheniformis. Por ejemplo, a 80ºC, desde aproximadamente 15-30 minutos es un período de tiempo suficiente para los preparados derivados del Bacillus subtilis, mientras que los derivados del Bacillus licheniformis requieren desde aproximadamente 45 a 60 minutos.

El empleo de materiales de hidrolizado de almidón, como materiales protectores tiene la ventaja adicional de que esencialmente no se introducen impurezas que necesitan separarse en etapas posteriores. El preparado de enzima alfa-amilasa ha de emplearse para obtener materiales de hidrolizado de almidón y la introducción de cantidades importantes de materiales de hidrolizado previamente formados no causará problemas de purificación posteriores. Por el contrario, cuando se sigue la segunda realización de este invento, con la cual el material protector comprende ion calcio, el ion calcio es una impureza que debe eliminarse posteriormente del producto final.

La segunda realización preferida de este invento utiliza ion calcio como material protector. Esta realización es particularmente útil cuando se emplean alfa-amilasas relativamente estables al calor, tales como las derivadas del Bacillus licheniformis.

Cuando se utiliza este procedimiento, debe considerarse el ion calcio total presente en el sistema, incluyendo el ya presente en el preparado bruto. Como el contenido de ion calcio varía de lote o tanda en tanda,

es necesario determinar el ion calcio presente. Puede añadirse una sal de calcio soluble en agua para llevar la concentración de ion calcio hasta un nivel predeterminado.

Es importante advertir que la presencia de ion calcio tiende a proteger la actividad de proteasa así como la actividad de alfa-amilasa. Por tanto, a los niveles de calcio superiores puede ser necesario un período de tratamiento relativamente mayor para inactivar esencialmente de un modo completo la enzima de proteasa.

La concentración del ion calcio que proporcionará la protección suficiente a la actividad de alfa-amilasa, se ha encontrado que está en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,5% en base seca, de enzima. Preferiblemente, la concentración es al menos aproximadamente 1,0%, en base seca. Las concentraciones de ion calcio de 2,0% o más, parecen tener un efecto perjudicial.

Generalmente, el nivel de proteasa en una alfa-amilasa de Bacillus licheniformis, tal como THERMAMYL se reduce en aproximadamente 90% simplemente tratando con calor la enzima "tal cual" (aproximadamente 1,0% de Ca^{++}) durante 60 minutos a 80ºC. Solamente se observa una pérdida del 5% en la actividad de alfa-amilasa.

Los preparados de alfa-amilasa exentos de proteasa, pueden emplearse luego para producir hidrolizados de almidón a partir de una variedad de fuentes de almidón de alto contenido de proteínas, tales como maíz, milo, trigo, etc. Estos incluyen productos tanto molidos en húmedo como en seco, tales como sémolas de maíz, diversas calidades de almidón de molino, abaleaduras de trigo, etc.

El empleo de alfa-amilasas que habían tenido la actividad de proteasa inactivada de acuerdo con este invento para la hidrólisis de las diversas fuentes de almidón produjo hidrolizados equivalente en composición de hidratos de carbono a los producidos a partir del almidón como materia prima. También es posible utilizar preparados de enzima alfa-amilasa que ya están exentos de cualquier cantidad importante de actividad proteolítica, tal como el preparado vendido bajo la marca registrada MAXAMYL LX 6000, vendido por Gist-Brocades, Delft, Holanda (derivado de Bacillus subtilis).

Se han obtenido resultados satisfactorios empleando tanto los procedimientos de hidrólisis que evitan la gelatinización del almidón como los descritos en las patentes antes mencionadas y los procedimientos de hidrólisis de enzima-enzima convencionales.

Se utilizaron los preparados de enzima siguientes produciendo hidrolizados a partir de fuentes de almidón.

1. alfa-amilasa THERMAMYL 60, lote AN-1009 a partir de Bacillus licheniformis. La actividad de proteasa original era 33.084 U/g y la actividad de alfa-amilasa 1006 U/g. Un volumen de enzima se diluyó con dos volúmenes de jarabe de maíz de 30% de sustancia seca y 42 de E.D. La mezcla se calentó desde la temperatura ambiente a 80ºC en 30 minutos, se mantuvo a 80ºC durante 75 minutos y luego se enfrió en un baño de hielo. Esto dió como resultado una actividad de alfa-amilasa de 323 U/g y una actividad de proteasa de 520 U/g.

2. alfa-amilasa MAXAMYL LX-6000 a partir de

Bacillus subtilis que tiene una actividad de alfa-amilasa de 14.955 U/g. Esta enzima tenía una relación de proteasa/ alfa-amilasa de menos de 1 y se empleó "tal cual".

3. Glucoamilasa derivada de Aspergillus niger que tiene una actividad de 284 U/g de glucoamilasa.

Se utilizaron las siguientes fuentes de almidón con resultados satisfactorios.

1. Sémolas de maíz: un producto de maíz molido en seco.
2. Abaleaduras de maíz: polvos finos del tamizado de granos de maíz.
3. Abaleaduras de trigo: un producto de trigo molido en seco.
4. Almidón de molino ligero: una suspensión de almidón desgerminado que contenía 10-12% de proteínas.
5. Almidón de molino pesado: una suspensión concentrada.
6. Segundo flujo inferior del hidrociclón: una suspensión de almidón de molino en la que las proteínas han sido reducidas hasta aproximadamente 1-1,5%.

Es necesario lavar previamente los materiales de almidón antes de introducir el preparado de enzima alfa-amilasa para separar los materiales solubles, principalmente cenizas y proteínas.

Es preferible que el prelavado sea efectuado a aproximadamente la temperatura ambiente puesto que a temperaturas superiores puede haber una solubilización

creciente de los materiales proteínicos y de hidratos de carbono.

Cuando se emplean productos molidos en seco tales como sémolas de maíz o abaleaduras de maíz, el prelavado se efectúa poniendo en suspensión una parte del material del almidón en 2 partes en peso de agua que contienen desde aproximadamente 200 ppm hasta aproximadamente 1000 ppm, y preferiblemente aproximadamente 500 ppm de SO_2 durante aproximadamente 1/2 hora a temperatura ambiente. La suspensión se filtra y se lava con al menos una parte adicional de la solución de SO_2.

Cuando se emplean materiales molidos en húmedo que están en forma de suspensión que ya incluye SO_2, se necesita simplemente filtrar y lavar con agua. Alternativamente estos materiales pueden también lavarse con la solución de SO_2.

El método de conversión de enzima de almidón granular (GS-EHE) se realiza de acuerdo con el procedimiento siguiente:

La torta resultante se pone en suspensión en agua hasta un contenido de sólidos del 30% y se convierte como sigue:

La suspensión se acondiciona a una temperatura de 60ºC, se añaden 50 ppm de Ca^{++} sobre una base de almidón seco, se ajusta el pH y se añade 1 U P.I. (proteasa inactivada) de THERMAMYL/ /g de sustancia seca. Se calienta a 75ºC a 1ºC/ 5 minutos hasta 70ºC y a continuación a 1ºC/ 15 minutos a 75ºC. Se coloca en un baño de agua hirviendo, se deja 15 minutos a 75ºC, se trata

térmicamente a 100ºC y se mantiene 15 minutos. Se enfría a 60ºC, se ajusta el pH a 4,3, se añaden 0,14 U de glucoamilasa/g de sustancia seca, se ajusta el pH a 5,5 y se añade extracto de malta al 0,2%. Se ajustan todos los hidrolizados finales a pH 4,3 antes de la filtración. El ajuste de pH inicial debe ser a aproximadamente 6,5 cuando se empleen materiales proteínicos de elevado contenido de molido en húmedo, y aproximadamente 5,5 cuando se empleen materiales de molido en seco o almidones que han sido purificados de proteínas.

Como el intervalo de temperatura de gelatinización para el almidón de trigo es aproximadamente 10ºC más bajo que para el almidón de maíz, el perfil de temperatura de dilución se cambia a 50ºC a 65ºC por ciclo.

El extracto de malta de cebada se preparó agitando 10,38 gramos de malta molida en 79,26 gramos de H_2O durante 1 hora, filtrando a continuación por gravedad a través de un papel Whatman nº 1. Por tanto, 10 ml del filtrado es equivalente a 1,2 g de malta en base seca.

De un modo similar, pueden emplearse los otros métodos de almidón granular o convencional antes mencionados.

Los preparados de alfa-amilasa exentos de proteasa, pueden utilizarse en métodos convencionales o de almidón granular que emplea un almidón original como material de partida. Estos almidones generalmente tienen un contenido de proteína de aproximadamente 0,30-0,35% o me-

nos. El empleo de preparados de alfa-amilasa exentos de proteasa proporcionará generalmente hidrolizados que tienen menos de aproximadamente 0,10% de proteína. Cuando se emplea un almidón original el prelavado no es necesario pero es preferible obtener el hidrolizado de la mejor calidad.

Con el fin de proporcionar una mejor comprensión del invento, se dan a continuación los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO I

El Ejemplo I ilustra el efecto de la concentración y el tipo de material sustrato sobre la inactivación de la actividad de enzima proteolítica durante el tratamiento térmico de un preparado de enzima alfa-amilasa que se deriva del Bacillus licheniformis. El preparado se mezcla con el material de sustrato y luego se mantiene a 80ºC durante un período de tiempo diseñado. Puede verse por un examen de estos datos que un jarabe de maíz con un E.D. de 11 y un jarabe de maíz con un E.D. de 42 protegen la actividad de alfa-amilasa contra la inactivación térmica, con lo cual se generan productos que tienen una relación de actividad P/α en el intervalo deseado. Sin embargo, la dextrosa no protege la actividad de alfa-amilasa.

Es importante advertir con respecto al Ejemplo I y también para los Ejemplos siguientes, que el ensayo de proteasa se realiza a un pH que varía entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 6,4, incluso aunque el pH durante el empleo sea posiblemente inferior, tal como de aproximadamente 5,5. Sin embargo, esto se ha encontrado que es necesario, dado que los ensayos de la proteasa a un pH de

5,5 no son lineales con el tamaño de la muestra.

La Tabla I muestra los resultados del Ejemplo I. El tratamiento térmico en presencia de sustratos de E.D. 11 o de E.D. 42 da como resultado una inactivación de proteasa de 93% y 96% respectivamente, a relaciones de enzima a sustrato de 1 a 1 y 1 a 2, respectivamente. No se observa pérdida significativa en la actividad de alfa-amilasa en cualquier relación. Sin embargo, cuando se emplea dextrosa como material sustrato protector, solamente se obtiene una inactivación de proteasa del 89% al 92% con una reducción de aproximadamente 12% en la actividad de alfa-amilasa.

También se ha determinado que en presencia de jarabe de maíz, aumentando el tiempo de tratamiento térmico de 60 a 75 o a 90 minutos aumenta la inactivación de proteasa solo ligeramente; es decir desde aproximadamente 91% a 95%, sin pérdida significativa de la actividad de alfa-amilasa. Reduciendo el tiempo de tratamiento térmico, sin embargo, se obtiene como resultado una disminución significativa en la inactivación de proteasa a solamente 73% después de 30 minutos. Es importante advertir que esencialmente el mismo grado de inactivación de proteasa también se obtuvo empleando jarabe de maíz que se ajustó a un nivel de pH de 5,5 o 7,0.

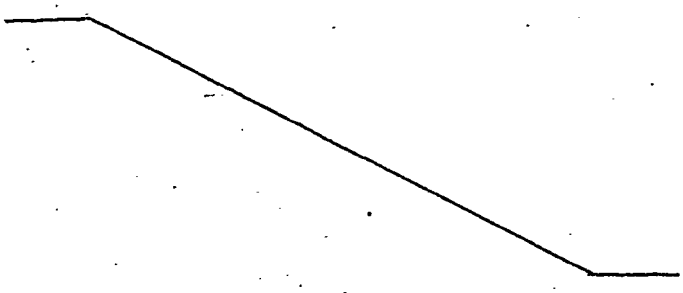

TABLA I

EFECTO DEL TIPO Y CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA INACTIVACION DE PROTEASA DURANTE EL TRATAMIENTO TERMICO DE THERMAMYL[a] a 80ºC.

Sustrato[b]	Relación en volumen de enzima: subtrato	Tratamiento térmico		Actividad de proteasa[c] U/ml		Inactivación de proteína, %	Actividad de alfa-amilasa, U/ml		% de inactivación ∝	Relación de actividad, P/∝
		Tiempo, min	pH	No tratado	Tratado térmicamente		No tratado	tratado térmicamente		
Jarabe de maíz de E.D. 11	1:1	60	6,4	17.080	1.325	92,2	591	585	Nada	2,3
Jarabe de maíz de E.D. 11	1:2	60	6,4	11.387	485	95,7	394	391	Nada	1,2
Jarabe de maíz de E.D. 42	1:1	60	6,4	17.080	1.190	93,0	591	603	Nada	2,0
Jarabe de maíz de E.D. 42	1:2	60	6,4	11.387	465	95,9	394	396	Nada	1,2
Dextrosa	1:1	60	6,3	17,080	1.850	89,2	591	522	11,7	3,5
Dextrosa	1:2	60	6,2	11.387	870	92,4	394	346	12,2	2,5

a) Lote AN1005, calcio 2,01% base seca, relación de actividad P/∝= 28,9

b) Sustratoa30% de sustancia seca, ajustado a pH 5,5 antes de la adición de enzima.

c) Determinado a pH 6,3.

EJEMPLO II

Se repitió el procedimiento del Ejemplo I empleando TENASE como preparado de enzima alfa-amilasa. El calentamiento se realizó con y sin adición de jarabe de maíz de E.D. 42 como material sustrato protector. Los resultados se recogen en la Tabla II.

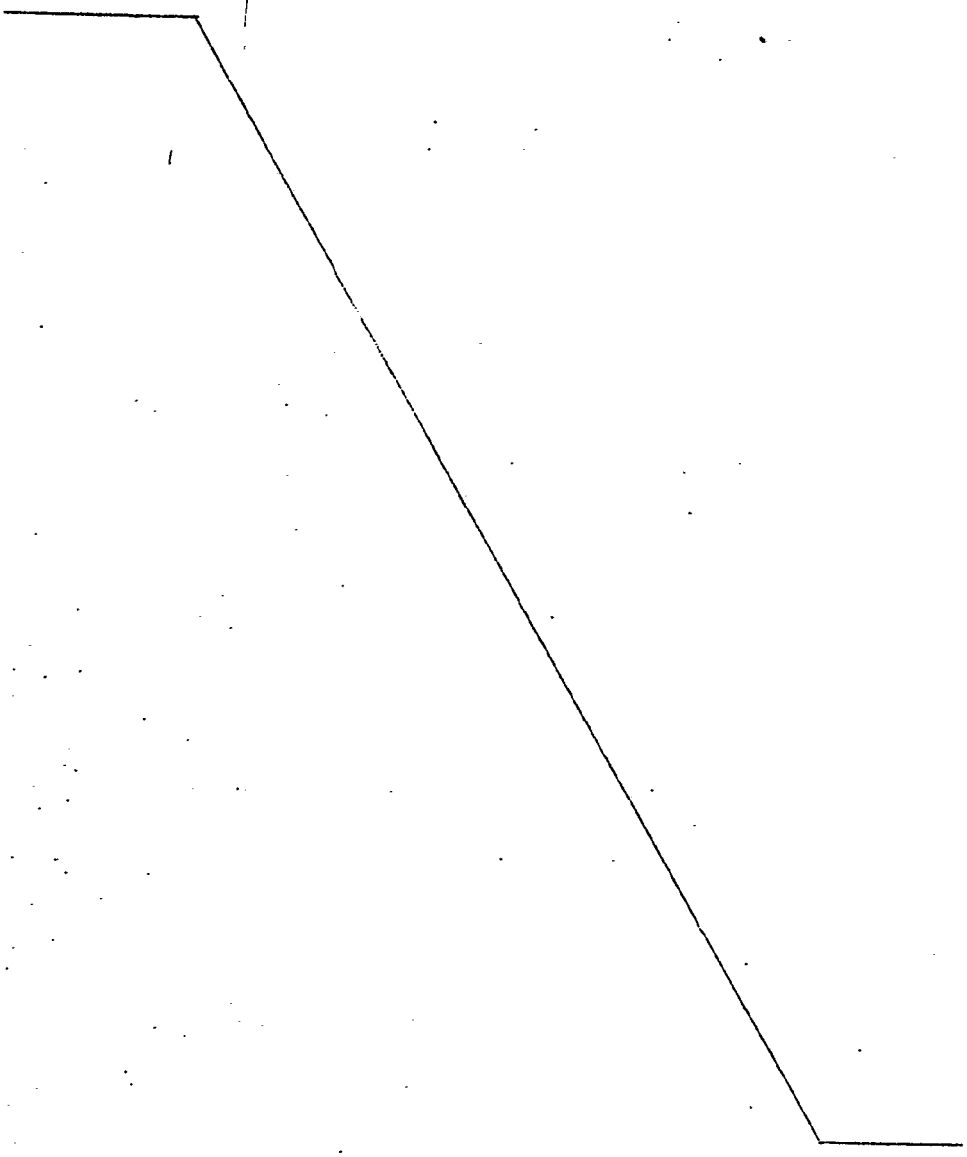

TABLA II

EFECTO DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO TERMICO SOBRE LA INACTIVACION DE PROTEASA EN TENASE

Tratamiento térmico		Actividad[a], U/g.		Inactivación, %		Relación de actividad P/α
Temp. °C	Tiempo min	Proteasa[b]	Amilasa	Proteasa	α	
Tenase (Lote LF-2155-C)[d] diluida con jarabe de maíz de 2 partes en volumen[c].						
No tratado		3328	589	-	-	5,7
80	15	230	570	92,8	4,9	0,4
80	30	Nada	574	100	2,5	<0,1
Tenase no diluida (Lote LF-2427-L)[e]						
No tratado		9410	1724	-	-	5,5
80	15	6967	N.D.	26,0	N.D.	N.D.
80	30	3213	904	65,9	55,1	3,6
80	45	2051	662	78,2	69,4	3,3

a) Actividades de LF-2155-C diluida determinadas sobre una base en volumen calculada sobre la base en peso empleando una densidad relativa determinada de 1 a 15.

b) Actividad de proteasa determinada a pH 6,5 para el lote LF-2155-C, 6,3 para el lote LF-2427-L.

c) Jarabe de maíz de E.D. 42 al 30% en peso/peso que contenía 200 ppm en base seca de calcio incorporado.

d) 1,55% de Ca^{++}, en base seca.

e) 1,94% de Ca^{++}, en base seca.

EJEMPLO III

Muestras de alfa-amilasa THERMAMYL (lote AN 1050) que contenían 0,50% de calcio en base seca, se trataron térmicamente durante varios períodos de tiempo a 80ºC. Las experiencias se realizaron tanto al pH inicial del preparado de alfa-amilasa como al pH ajustado a 5,5. La Tabla III resume los resultados.

Los resultados muestran que un tratamiento térmico de 60 minutos a cualquier pH produce relaciones de actividad de proteasa/alfa-amilasa de menos de 2. Prolongando el tiempo de calentamiento hasta 120 minutos se produjo una relación de 0,6, pero se obtuvo un sacrificio de 11%-13% de la actividad de alfa-amilasa.

A un pH de 5,5 se obtuvo una inactivación ligeramente superior de tanto la proteasa como la alfa-amilasa a un pH de 6,4, debido a la estabilidad de enzima generalmente reducida en el medio más ácido.

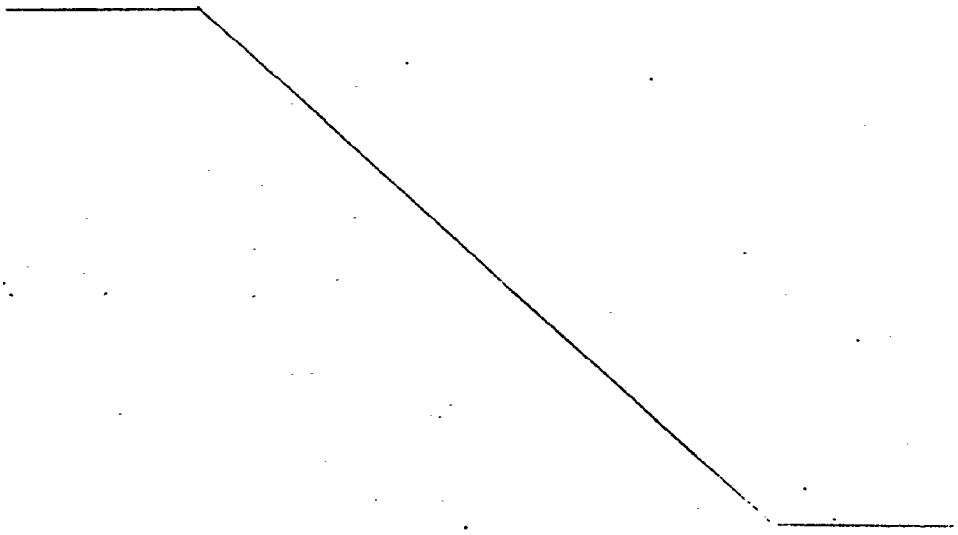

TABLA III

EFECTO DEL TIEMPO Y pH DE TRATAMIENTO TERMICO SOBRE LA INACTIVACION DE PROTEASA EN THERMAMYL[a)]

Tratamiento térmico		Actividad, U/g		Inactivación, %		Relación de Act.
Temperatura ºC	Tiempo min.	Proteasa	α-amilasa	Proteasa	α-amilasa	P/α
			pH 6,4			
No tratado		19.528	1.075	-	-	18,2
80	30	4.517	999	76,9	7,1	4,5
80	45	2.960	1.026	84,8	4,6	2,9
80	60	1.980	1.022	89,8	4,9	1,9
80	75	1.598	1.003	91,8	6,7	1,6
80	90	1.152	964	94,1	10,3	1,2
80	120	708	956	96,3	11,1	0,7
			pH 5,5			
No tratado		20.937	1.005	-	-	20,8
80	45	2.038	992	90,3	8,3	2,2
80	60	1.520	920	92,7	8,5	1,7
80	75	1.072	916	94,9	8,9	1,2
80	90	762	896	96,4	10,8	0,9
80	120	356	870	98,3	13,4	0,4

a) Lote AN1050, 0,50% de calcio en base seca, tratado con calor en ausencia de hidratos de carbono.

EJEMPLO IV

Se trataron con calor muestras de varios lotes de THERMAMYL a 80ºC durante 60 minutos. Antes del tratamiento térmico, el nivel de ion calcio de cada lote se ajustó a un porcentaje previamente determinado por adición de $CaCl_2$. Las actividades de la proteasa residual y alfa-amilasa se muestran en la Tabla IV. A medida que aumenta el contenido de calcio en THERMAMYL desde 0,04% a 2,0%, la inactivación de proteasa disminuye desde el 100% hasta el 91%. En cada caso, la inactivación de alfa-amilasa disminuye desde 25% a 0,04% de calcio hasta aproximadamente 5% al 1% de calcio. Aumentando el nivel de calcio al 2% se obtiene como resultado una inactivación creciente de 7%-16%.

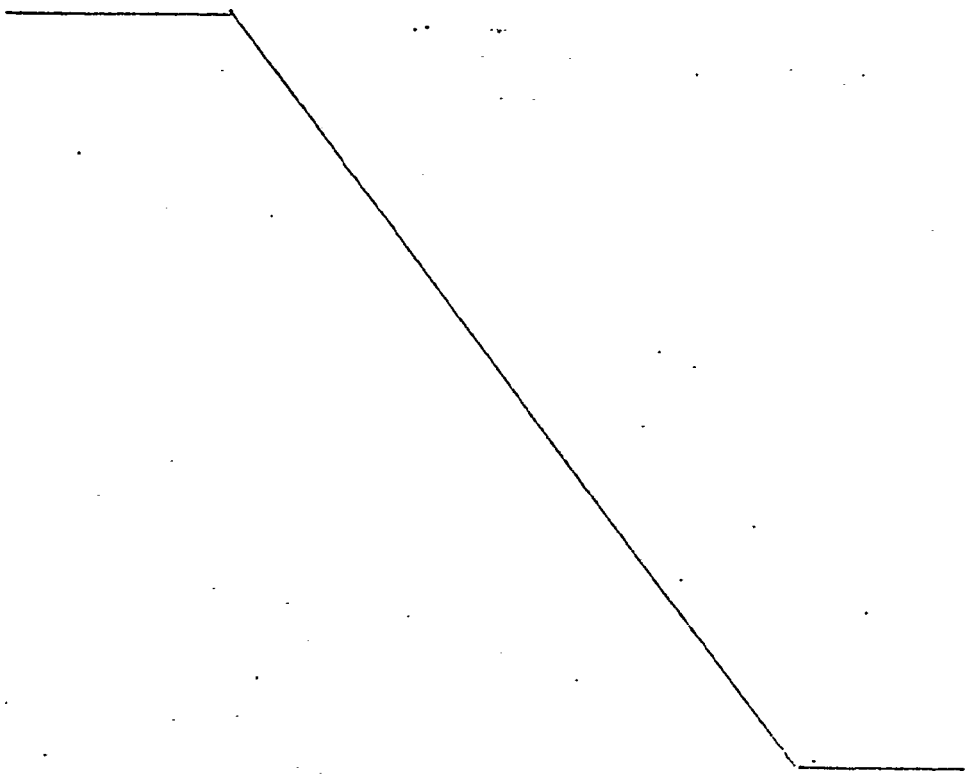

TABLA IV

EFECTO DEL CONTENIDO DE CALCIO SOBRE LA INACTIVACION DE PROTEASA EN THERMAMYL[a)]

Lote	Ca^{++} total % b.s.	% S.s.	Act. de Proteasa U/g No tratado	Act. de Proteasa U/g T. T.	Act. de α-amilasa U/g No tratado	Act. de α-amilasa U/g T. T	Inactivación, % Proteasa	Inactivación, % α	Relación Act. P/α
AN1001	0,04	35,4	16.178	27	1069	802	99,8	25,0	0,03
AN1001	0,25	34,3	15.218	64	1031	805	99,6	21,9	0,08
AN1001	0,50	34,3	15.173	597	1010	904	96,1	10,5	0,66
AN1050	0,50	26,0	19.528	1.980	1075	1022	89,8	4,9	1,94
AN1001	1,00	34,6	15.659	853	971	935	94,6	3,7	0,91
AN1069	1,00	29,0	19.746	2.229	1061	1000	88,7	5,7	2,23
AN1001	2,00	33,9	15.899	869	984	911	94,5	7,4	0,95
AN1005	2,01	30,4	29.211	2.645	999	834	90,9	16,5	3,17

S.S. = sustancia seca

b.s. = base seca

T.T. = tratamiento térmico

a) Tratamiento térmico realizado en ausencia de hidrato de carbono, 80ºC, 60 minutos.

EJEMPLO V

Diferentes lotes de THERMAMYL que contenían 0,04% a 2,21% de calcio se diluyeron con 2 partes de jarabe de maíz de pH 5,5, 30% de s.s., D.E. 42 y se trataron con calor a 80ºC durante 30, 60 y 90 minutos y a 85ºC durante 10, 20 y 30 minutos. En todos los casos el pH durante el tratamiento térmico fue de 6,2-6,6. Los datos mostrados en la Tabla V indican que:

a) El tratamiento térmico de THERMAMYL, lote AN1001, a 80ºC u 85ºC da como resultado una inactivación de proteasa esencialmente completa con menos de 7% de pérdida en actividad de alfa-amilasa.

b) Se obtiene más inactivación de alfa-amilasa pero menos de proteasa con el lote AN1002 que con los otros lotes de THERMAMYL. La razón de esto no se entiende.

c) Los datos obtenidos con los lotes AN 1005 y 1009 indican que (1) 90 minutos a 80ºC inactivan 93%-97% de proteasa con una pérdida del 8% o menor en alfa-amilasa, y (2) 10-30 minutos a 85ºC inactivan 97%-100% de proteasa junto con aproximadamente 7%-16% de alfa-amilasa.

TABLA V

PARAMETROS QUE CONTROLAN LA INACTIVACION SELECTIVA DE PROTEASAS EN ALFA-AMILASA DE THERMAMIL[a)]

Tratamiento térmico Temp. ºC	Tiempo min.	Actividad después del tratamiento térmico, U/ml. Proteasa	α-amilasa	Inactivación, % Proteasa	α-amilasa	Relación P/α
		Lote AN1001 (0,04% en b.s. de Calcio)				
80	30	30	N.D.	99,6	Nada[c)]	0,1
85	10	55	409	99,2	7,3	0,1
85	20	0	417	100	5,4	0,0
85	30	30	444	99,6	Nada	0,1
		Lote AN1002 (0,89% en b.s. de Calcio				
80	30	2860	N.D.	69,8	N.D.	6,5[b)]
80	60	1965	N.D.	79,2	N.D.	4,5[b)]
80	90	1055	385	88,9	12,3	2,7
85	10	1385	361	85,3	17,8	3,8
85	20	405	341	95,7	22,3	1,2
85	30	270	356	97,8	18,9	0,8
		Lote AN1005 (2,01% en b.s. de Calcio)				
80	30	3291[c)]	N.D.	71,1	Nada	8,4
80	60	465[c)]	396	95,9	Nada	1,2
80	90	774[c)]	N.D.	93,2	Nada	2,0
85	10	400	363	96,5	7,9	1,1
85	20	0	342	100	13,2	0,0
85	30	40	359	99,6	8,9	0,1
		Lote AN1009 (2,21% en b.s. de Calcio)				
80	30	3680	N.D.	73,0	N.D.	9,1
80	60	1460	N.D.	89,3	N.D.	3,6
80	90	475	369	96,5	8,4	1,3
85	10	430	346	96,8	14,1	1,2
85	20	0	337	100	16,4	0,0
85	30	30	376	99,8	6,7	0,1

a) Enzima diluída con dos partes en volumen de jarabe de maíz al 30% de E.D. 42 antes del tratamiento térmico.

b) Suponiendo que no hay ninguna pérdida de la actividad de alfa-amilasa de las muestras no ensayadas.

c) Determinada a pH 5,5

EJEMPLO VI

El procedimiento de inactivación de proteasa se amplió a escala por preparación de dos grandes lotes de enzima para estudios de conversión. Los tamaños de lote de 2600 y 6655 ml consistían en THERMAMYL (Lote AN1009) diluído con dos partes en volumen del jarabe de maíz de E.D. 42 a pH 5,5, con 30% de sólidos. La enzima diluída (pH 6,2) se calentó a 80ºC en 30 minutos en un baño de agua calentado con vapor, se mantuvo a esta temperatura durante 75 minutos y se enfrió a la temperatura ambiente en aproximadamente 30 minutos. El pH final era 5,9. La inactivación de proteasa era de 93%-96% con solamente una pérdida de aproximadamente 3% en la actividad de alfa-amilasa. Estos dos lotes de THERMAMYL tratado térmicamente se emplearon para convertir el almidón original y el almidón de molino, respectivamente, en hidrolizados de dextrosa empleando el procedimiento de enzima-calor-enzima (EHE) de almidón granular.

EJEMPLO VII

Sémolas de maíz se pusieron en suspensión en agua y se diluyeron con preparados de enzima de THERMAMYL que habían sido tratadas con calor para dar varias cantidades de inactivación de proteasa. Una serie se sacarificó luego a pH 5,5 con glucoamilasa derivada de Aspergillus niger y la otra con alfa-amilasa. Los resultados se resumen en las Tablas VI y VII.

TABLA VI

EFECTO DE LA RELACION DE ACTIVIDAD DE PROTEASA/ALFA-AMILASA EN THERMAMYL SOBRE LA PREPARACION DE HIDROLIZADOS DE DEXTROSA A PARTIR DE SEMOLAS DE MAIZ[a].

Experiencia Nº	61	62	63	64	65
Tratamiento de THERMAMYL					
Lote	AN1001	AN1005	AN1009	AN1009	AN1001
Temperatura, ºC	80	80	80	80	No tratado
Tiempo, minutos	30	60	60	30	"
Relación de Act. P/A	0,1	1,2	3,6	9,1	15,5
Análisis de hidrolizados, b.s.					
% de s.s.,	29,4	29,5	29,5	29,7	29,7
Dextrosa, %	93,8	93,8	94,0	94,0	93,6
Proteínas, %	0,18	0,22	0,25	0,34	0,48
N Amino, ppm	31	36	42	57	89
Caudal de filtración, litro/min/m^2	8	11	10	10	11
Análisis de residuos, solubles Base libre, b.s.					
% de s.s.	97,0	97,0	97,2	98,0	98,2
Proteínas, %	65,7	66,1	66,4	66,7	66,9
Almidón, %	7,0	6,8	7,2	7,2	7,1
Solubilización, % de b.s.					
Almidón	99,1	99,2	99,1	99,1	99,1
Total	88,5	88,2	88,2	88,2	89,1

a) Las experiencias se realizaron por el procedimiento GS-EHE a 75ºC, empleando prelavado con 0,05% de SO_2, 50 ppm de calcio y sacarificación a pH 5,5. Dosificación de glucoamilasa 0,14 U/g de s.s.

TABLA VII

EFECTO DE LA RELACION DE ACTIVIDAD DE PROTEASA/ALFA-AMILASA EN THERMAMYL SOBRE LA PREPARACION DE JARABE DE ELEVADA RELACION MALTOSA/MALTOTRIOSA A PARTIR DE SEMOLAS DE MAIZ[a)]

Experiencia nº	54	55	56	57	58
Tratamiento de THERMAMYL					
Lote	AN1001	AN1005	AN1009	AN1009	AN1001
Temp. ºC	80	80	80	80	No tratado
Tiempo, minutos	30	60	30	30	No tratado
Relación de actividad P/α	0,1	1,2	3,6	9,1	15,5
Análisis de hidrolizados b.s.					
% s.s.	27,9	27,9	27,8	27,8	27,9
D.E.	47	46	46	46	46
DP-1, %	3	4	4	4	4
-2, %	53	52	51	53	53
-3, %	22	24	24	24	24
Proteínas, %	0,12	0,16	0,18	0,25	0,42
Amino N., ppm	20	26	32	47	83
Caudal de filtro l/min/m^2	10	10	11	11	11
Análisis de residuos, solubles base libre b.s.					
% de s.s.	96,6	96,6	96,7	97,6	97,3
Proteínas, %	63,8	62,9	64,3	63,6	64,4
Almidón, %	11,0	11,0	6,9?	10,0	9,5
Solubles, %	1,3	2,4	1,2	0,8	1,2
Solubilización, % de b.s.					
Almidón	98,6	98,6	99,1	98,7	98,8
Total	88,4	88,6	88,5	88,6	88,9

a) Experiencias efectuadas por el procedimiento de GS-EHE a 75ºC empleando extracto de malta de cebada.

EJEMPLO VIII

El efecto del nivel de proteasa en la licuefación a temperatura elevada se estudió brevemente empleando THERMAMYL (Lote AN1009) que se trataba bien térmicamente para inactivar las proteasas (relación $P/\alpha = 1,4$) o se empleaba "tal cual" sin inactivación de proteasa (relación $P/\alpha = 32,9$). Las suspensiones de almidón al 25% en p/p, pH 6,2, que contenían 200 ppm de calcio añadido en base seca se inocularon con 2 U/g de s.s. de THERMAMYL. Las suspensiones se mantuvieron a 50ºC bien durante 30 minutos o 24 horas antes de la licuefación. El largo tiempo de permanencia se empleó para simular un caso extremo en las condiciones de procedimiento reales. Cada suspensión se diluyó empleando calentamiento indirecto a 90ºC durante 90 minutos, pH 6,2 y se sacarificó durante 96 horas a pH 4,3, 60ºC con 14 U/100 g de s.s. de glucoamilasa. Los datos medios obtenidos en esta serie y en un duplicado se muestran en la Tabla VIII. Los resultados indican que aumentando el tiempo de permanencia de 30 minutos a 24 horas resulta una proteína ligeramente más soluble en los hidrolizados finales. Sin embargo, el factor principal que influye en el contenido de proteína del hidrolizado es el nivel de proteasa en la alfa-amilasa. Empleando el THERMAMYL tratado (bajo en proteasa) el nivel de proteína se reduce desde una media de 0,21% a 0,13% - una reducción del 38%.

TABLA VIII

EFECTO DEL CONTENIDO DE PROTEASA EN THERMAMYL EN UN PROCEDIMIENTO DE DEXTROSA DE ENZIMA-ENZIMA

Experiencia Nº	1 y 5	2 y 6	3 y 7	4 y 8
THERMAMYL	No tratado	Tratado	No Tratado	Tratado
Relación de Act. de proteasa/α	32,9	1,4	32,9	1,4
Tiempo de permanencia de la suspensión de almidón, 50ºC a)	24 hr	24 hr	30 min	30 min
Licuefación b) % de s.s.	26,8	26,8	26,7	26,5
D.E.	22,2	21,9	19,2	19,1
Sacarificación c) % de s.s.	28,5	28,5	28,5	28,5
Dextrosa, % en b.s.	94,9	95,4	95,4	95,3
Proteínas, % en b.s.	0,22	0,15	0,20;	0,11
Ins., % en b.s.	1,16	1,31	1,31	1,42

a) Una suspensión de almidón de maíz al 25% en p/p que contenía 2 U/g de s.s. de THERMAMYL + 200 ppm de calcio añadido en b.s. se mantuvo a 50ºC, pH 6,2 durante el tiempo indicado antes de la licuefación.

b) Calentamiento indirecto a 90ºC, 90 minutos, pH 6,2

c) 60ºC, pH 4,3, 96 horas, 0,14 U/g de s.s. de GA.

EJEMPLO IX

El procedimiento GS-EHE a 75ºC se empleó para evaluar las sémolas de maíz y las abaleaduras de maíz. Los resultados se resumen en las Tablas IX y X. Con fines comparativos, las sémolas de maíz se convirtieron por el procedimiento de enzima-enzima a 90ºC. Las sémolas se lavaron previamente con una solución de 500 ppm de SO_2, se licuaron calentando 90 minutos a 90ºC, y luego se convirtieron con glucoamilasa o extracto de malta. Los resultados en la Tabla XI muestran que la composición y calidad del hidrolizado son las mismas que se obtienen por el procedimiento a 75ºC. Sin embargo, la solubilización del almidón y el caudal de filtración son mayores empleando el procedimiento a 75ºC, constituyendo el procedimiento a 75ºC un método preferido de conversión.

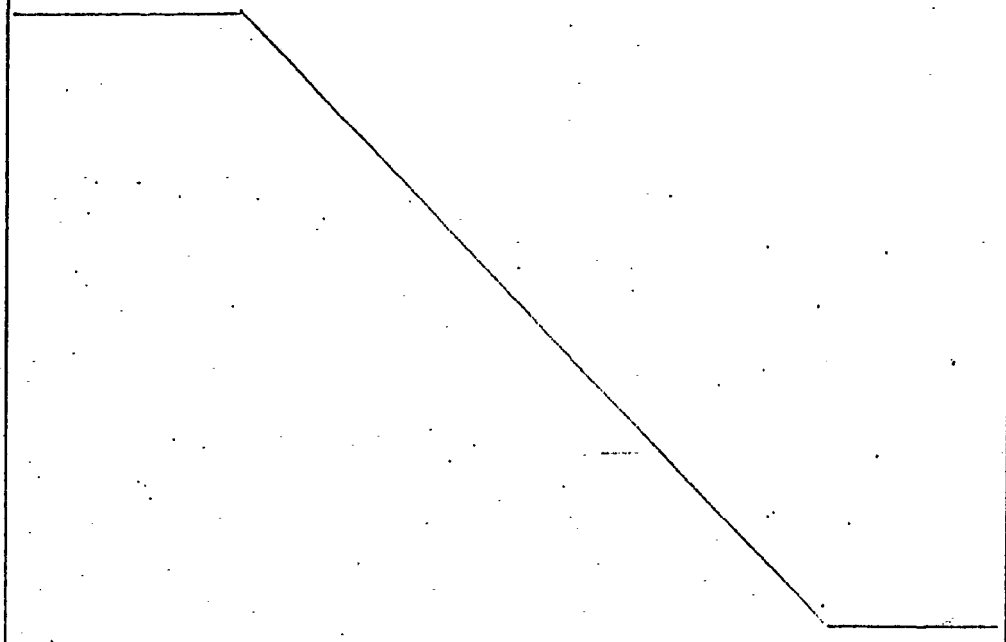

TABLA IX

CONVERSION DE SEMOLAS DE MAIZ

	GEH-32
Prelavado	0,05 % SO_2
Solubles eliminados % en b.s.	1,8
Sacarificación	GA
Análisis de hidrolizados, b.s	
% de s.s.	29,4
Dextrosa, %	94,5
Proteínas, %	0,33
N amino, ppm	75
Caudal de filtración, litros/min/m^2	3
Análisis de los residuos, b.s. a)	
% de s.s.	97,5
Almidón, %	13,8
Proteínas, %	67,3
Solubles, %	2,0
Solubilización, b.s.	
Total % b)	88,1
Almidón, % c)	98,2

Condiciones: Sémolas de maíz lavadas con 30% en p/p de SO_2.

Se diluyó con 1 U P.I. de THERMAMYL/g de s.s. -50 ppm de Ca^{++} -pH 6,5

Se calentó de 60ºC a 75ºC en dos horas -tratado térmicamente a 100ºC.

Se convirtió con 0,14 U de GA/g de s.s. -pH 4,3-96 horas a 60ºC.

a) Corregido a base libre de solubles

b) Incluidos solubles eliminados en el prelavado

c) Se supone que no hay pérdida de almidón en el prelavado.

TABLA X

CONVERSION DE LAS ABALEADURAS DE MAIZ

	GEH-21	GEH-25
Prelavado	0,05% SO_2	0,05% SO_2
Solubles eliminados, % en b.s.	6,2	6,3
Sacarificación	Malt X	GA
Análisis de hidrolizados, b.s.		
% de s.s.	24,2	25,3
Dextrosa, %	-	91,2
D.E.	44,1	-
DP-1, %	5,9	-
DP-2, %	54,5	-
DP-3, %	22,6	-
DP-4 +, %	17,0	-
Proteínas, %	0,8	2,2
N amino, ppm	N.D.	360
Régimen de filtración, litros/min./m^2	<1	<1
Análisis de residuos, b.s. [a]		
% de s.s.	98,7	97,9
Almidón, %	4,7	4,3
Proteínas, %	32,3	30,8
Solubles, %	1,1	1,2
Solubilización, b.s.		
Total, % [b]	75,8	75,5
Almidón, % [c]	98,4	98,5

Condiciones: Abaleaduras de maíz lavadas con 30% en p/p de SO_2; diluídas con 1 U P.I. THERMAYL/G de s.s.-50 ppm de Ca^{++}-pH 6,5-calentado desde 60ºC a 75ºC en dos horas- tratado térmicamente a 100ºC- convertido con 0,14 U GA/g de s.s.- pH 4,3 - 96 horas a 60ºC (GEH-25) o 0,2% de extracto de malta - pH 5,5 - 24 horas a 60ºC (GEH-24).

a) Corregido a base libre de solubles

b) Incluye solubles eliminados en el prelavado

c) Se supone que no hay pérdida de almidón en el prelavado.

TABLA XI

CONVERSION DE SEMOLAS DE MAIZ EMPLEANDO EL PROCEDIMIENTO DE ENZIMA-ENZIMA A 90ºC.

Experiencia Nº	GEH-59	GEH-92	GEH-60	GEH-10
Procedimiento	90ºC E-E	GS-EHE	90ºC E-E	GS-EHE
Sacarificación	Malt X	Malt X	GA	GA
Análisis de hidrolizados, b.s.				
Sustancia seca, %	26,6	28,2	28,9	29,6
Dextrosa, %	N.D.	N.D.	96,2	94,9
D.E.	41,0	44,6	N.D.	N.D.
DP-1, %	2,0	2,8	N.D.	N.D.
DP-2, %	53,2	51,6	N.D.	N.D.
DP-3, %	24,7	27,0	N.D.	N.D.
DP-4, +, %	20,1	18,6	N.D.	N.D.
Proteínas, %	0,10	0,14	0,37	0,35
N amino, ppm	20	N.D.	95	87
Ca^{++}, ppm	147	N.D.	102	47
Caudal de filtración Litros/min/m^2	≤ 1	9	3	10
Análisis de residuos, b.s. [a]				
Sustancia seca, %	96,5	97,8	96,6	97,2
Almidón, %	11,3	9,6	17,6	9,6
Proteínas, %	56,1	66,8	57,4	72,9
Solubles, %	1,7	1,5	3,2	1,6
Solubilización, b.s.				
Total, % [b]	86,3	88,3	87,0	98,8
Almidón, % [c]	98,3	98,7	97,5	98,8

Condiciones: Sémolas de maíz lavadas con 30% en p/p de SO_2 - diluído con 1 U P.I. de THERMAMYL/g de s.s - 50 ppm de Ca^{++} - pH 6,5 - calentado dos horas a 90ºC- convertido con 0,14 U GA/g de s.s.- 96 horas a 60ºC o 0,2% de extracto de malta - 24 horas a 60ºC

a) Corregido a base libre de solubles

b) No incluye pérdidas de solubles en el prelavado (excepto GEH-92)

c) Se supone que no hay pérdida de almidón en el prelavado.

EJEMPLO X

Almidón de molino pesado y una suspensión de almidón de la que se había separado parcialmente la proteína (segundo flujo inferior del hidrociclón) se convirtieron empleando el procedimiento G3-EHE para ilustrar el empleo de fuentes de almidón de elevado contenido de proteína molido en húmedo. Los resultados se recogen en las Tablas XII, XIII y XIV.

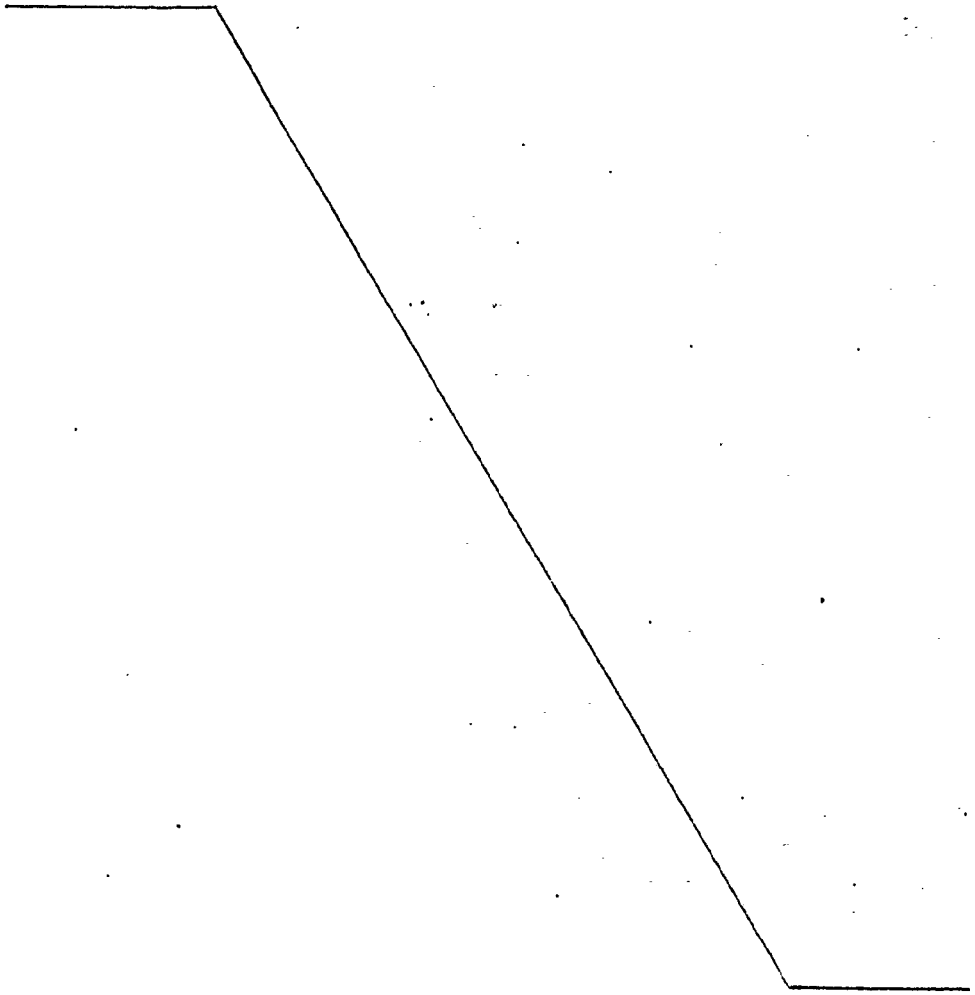

TABLA XII

CONVERSION DEL ALMIDON DE MOLINO PESADO

Experiencia Nº	GEH-78	80	82	79	81	83
pH de sacarificación	4,3	4,3	4,3	5,5	5,5	5,5
Sustancia seca de reposición, %	33,1	33,1	33,3	33,1	33,1	33,3
Análisis de hidrolizado, b.s.						
Sustancia seca, %	33,5	33,0	33,5	33,2	33,0	33,7
Dextrosa, %	94,4	94,3	94,7	93,5	93,5	93,6
Proteínas, %	0,48	0,48	0,49	0,40	0,40	0,41
N amino, ppm	190	180	205	95	90	95
Calcio, ppm	48	55	38	64	60	60
Caudal de filtración litros/min/m^2	5	4	7	1	5	5
Análisis de residuos, b.s.[a]						
Sustancia seca, %	94,5	95,0	96,0	92,6	96,0	95,7
Almidón, %	9,0	8,4	7,8	10,6	6,5	7,6
Proteínas, %	71,2	72,8	72,9	68,6	72,7	72,2
Solubles, %	0,8	1,2	1,5	2,5	0,9	0,8
Solubilización b.s.						
Total, %[b]	90,4	89,6	90,2	90,0	89,6	90,1
Almidón, %[c]	99,0	99,0	99,1	98,8	99,2	99,1

Condiciones: 30% en p/p de almidón de molino lavado. Se diluyó con 1 U P.I. de THERMAMYL/g de s.s. -50 ppm de Ca^{++} - pH 6,5 calentado desde 60ºC hasta 75ºC en 2 horas- tratado térmicamente a 100ºC. Se convirtió con 0,14 U GA/g de s.s. - pH 4,3 - 96 horas a 60ºC o 0,18 U GA/g de s.s. - pH 5,5 - 96 horas a 60ºC.

a) Corregido hasta base libre de solubles

b) No incluye solubles eliminados en el prelavado

c) Se suppne que no hay pérdida de almidón en el prelavado.

TABLA XIII

HIDROLIZADOS DE DEXTROSA PREPARADOS A PARTIR DEL SEGUNDO FLUJO INFERIOR DEL HIDROCICLON

Experiencia Nº	DU-1	DU-2	DU-3	DU-4	DU-5
Prelavado con H_2O	1X	1X	1X	3X	3X
Dilución					
Enzima	---------- P.I. THERMAMYL ----------				
Dosificación, U/g de s.s.	1	1	1	1	1
pH	5,5	6,5	5,5	6,5	5,5
Ca^{++} añadido, ppm en b.s.	50	50	50	50	50
Sacarificación					
GA, U'g de s.s.	0,14	0,14	0,14	0,14	0,18
pH	4,3	4,3	4,3	4,3	5,5
Análisis de hidrolizados, b.s.					
Sustancia seca, %	33,7	33,7	32,9	32,9	32,7
Dextrosa, %	94,8	94,4	94,6	65,1	95,0
Proteínas, %	0,19	0,24	0,16	0,22	0,13
N amino, ppm	60	85	55	75	20
Ca^{++}, ppm en b.s.	60	58	58	62	68
Caudal de filtración, litros/min/m^2	5	3	9	5	6
Insolubles totales, % en b.s.	2,8	3,1	2,8	3,0	2,7

Condiciones: 30% en p/p del segundo flujo inferior del hidrociclón lavado. Dosificada y calentada desde 60ºC hasta 75ºC en dos horas, tratada térmicamente a 100ºC. Convertida con GA-96 horas a 60ºC.

TABLA XIV

CONVERSION EN MALTA DEL SEGUNDO FLUJO INFERIOR DEL HIDROCICLON

Experiencia Nº	LK-106	LK-107	LK-108	GEH-22
Prelavado	Ninguno	6X-H_2O	12X-H_2O	0,05% SO_2
Solubles eliminados,% en b.s.	Ninguno	0,7	0,7	0,9
Análisis de hidrolizados, b.s.				
Sustancia seca, %	31,0	31,0	31,0	30,9
D.E. %	43,4	43,6	42,1	43,1
DP-1, %	0,9	0,9	0,8	1,3
DP-2, %	57,0	56,6	58,0	54,7
DP-3, %	20,8	18,6	18,5	22,8
DP-4 +, %	21,3	23,9	22,7	21,2
Proteínas, %	0,47	0,10	0,09	0,16
Solubilización, b.s.				
Total, %	96,9	96,8	96,7	96,8

Condiciones: 30% en p/p del segundo flujo inferior de hidrociclón lavado. Se diluyó con 1 P.I. de THERMAMYL U/g de s.s., pH 6,5, 50 ppm de calcio añadido, temperatura aumentada desde 60ºC hasta 75ºC en dos horas, tratamiento térmico a 100ºC. Se convirtió con 0,2% de extracto de malta de cebada, pH 5,5 a 60ºC, 24 horas.

EJEMPLO XI

El almidón de molino ligero se convirtió empleando el procedimiento GS-EHE a 75ºC variando diversos parámetros del procedimiento.

La Tabla XV ilustra el efecto del tiempo de sacarificación sobre la composición del hidrolizado. La Tabla XVI ilustra el efecto del pH de sacarificación. La Tabla XVII, experiencia GEH-71 ilustra el efecto de añadir alfa-amilasa adicional a la etapa de sacarificación. La experiencia GEH-72 emplea MAXAMYL en lugar de THERMAMYL como alfa-amilasa. La experiencia GEH-73 representa el calentamiento del almidón diluido a 121ºC en lugar de la temperatura normalizada de 100ºC. El almidón de molino ligero se convirtió también con una combinación de THERMAMYL y glucoamilasa a una temperatura de 60ºC. Los resultados están en la Tabla XVIII.

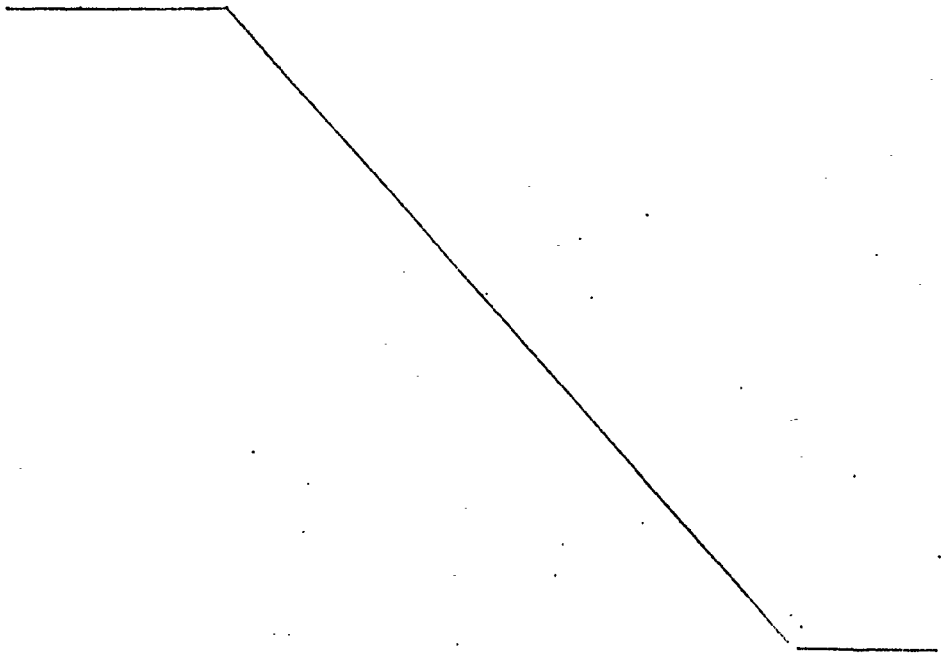

TABLA XV

CONVERSION DEL ALMIDON DE MOLINO LIGERO: EFECTO DEL TIEMPO DE SACARIFICACION

Sacarificación pH	% de s.s. 4,3	% de s.s. 5,5	Dextrosa % de s.s. 4,3	Dextrosa % de s.s. 5,5	Proteínas % de s.s 4,3	Proteínas % de s.s 5,5	Nitrog amínico ppm en b.s. 4,3	Nitrog amínico ppm en b.s. 5,5
Tiempo de sacarificación								
24 horas	30,6	30,7	90,2	86,1	0,41	0,35	130	80
48 horas	31,3	30,8	93,9	91,9	0,46	0,38	160	80
72 horas	30,9	30,8	94,7	93,6	0,47	0,40	170	85
96 horas	31,2	30,9	94,5	93,4	0,49	0,41	180	85
115 horas	31,2	30,9	94,5	94,2	0,50	0,42	190	100

Condiciones: 30% en p/p de almidón de molino lavado (3X-H,O) -diluido con 1 U P.I. de THERMAMYL/g de s.s. 50 ppm de Ca^{++} - pH 6,5 calentado desde 60ºC hasta 75ºC en 2 horas - tratamiento térmico a 100ºC. Se convirtió con 0,14 GA/g de s.s. - pH 4,3 - 96 horas a 60ºC o 0,18 U GA/g de s.s.- pH 5,5 - 96 horas a 60ºC.

Experiencia Nº GEH-74 para pH 4,3; GEH-75 para pH 5,5.

TABLA XVI

CONVERSION DE ALMIDON DE MOLINO LIGERO: EFECTO DEL pH DE SACARIFICACION

Experiencia Nº	GEH-66	GEH-70	GEH-67	GEH-69
Prelavado	3X-H_2O	3X-H_2O	3X-H_2O	3X-H_2O
Solubles eliminados	8,8	9,3	8,7	9,3
Sustancia seca de reposición	32,7	30,5	33,1	30,5
pH de sacarificación	5,5	5,5	4,3	4,3
Análisis de hidrolizado, b.s.				
Sustancia seca, %	33,8	31,0	34,0	30,9
Dextrosa, %	94,2	93,5	95,3	94,7
Proteínas, %	0,29	0,47	0,38	0,53
N amino, ppm	60	110	160	215
Caudal de filtración, litros/min/m^2	3	3	6	7
Análisis de residuos, b.s. [a]				
Sustancia seca, %	96,9	95,8	97,8	96,5
Almidón, %	10,6	4,7	11,5	4,0
Proteínas, %	70,0	75,9	67,9	76,4
Solubles, %	2,3	6,0	2,0	5,4
Solubilización, b.s. [b]				
Total, % [c]	90,9	91,9	91,3	92,0
Almidón, %	98,9	99,6	98,8	99,6

Condiciones: 30% en p/p de almidón de molino lavado - diluido con 1 U P.I. de Thermamyl/g de s.s.- 50 ppm de Ca^{++} - pH 6,5 - calentado de 60ºC a 75ºC en 2 horas - tratado térmicamente a 100ºC - convertido con 0,14 U GA/g de s.s. - pH 4,3 - 96 horas a 60ºC o 0,18 U GA/g de s.s. - pH 5,5 - 96 horas a 60ºC.

a) Corregido para base libre de solubles.

b) No incluye solubles eliminados en el prelavado

c) Se supone que no se elimina almidón en el prelavado.

TABLA XVII

CONVERSION DE ALMIDON DE MOLINO LIGERO: EFECTO DE ALFA-AMILASA Y LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO TERMICO

Experiencia Nº	GEH-71[a]	GEH-72[b]	GEH-73[c]
pH de sacarificación	5,5	4,3	4,3
Análisis de hidrolizado, b.s.			
Sustancia seca, %	31,0	30,6	31,4
Dextrosa, %	93,5	94,9	90,7
Proteínas, %	0,56	0,49	0,62
N amino, ppm	135	200	450
Ca^{++}, ppm	69	217	109
Caudal de filtración, litros/min/m^2	4	<1	3
Análisis de residuo, b.s.[d]			
Sustancia seca, %	95,8	Desechado	95,5
Almidón, %	3,9	"	12,1
Proteínas, %	76,9	"	71,7
Solubles, %	6,1	"	6,6
Solubilización, b.s.			
Total, %[e]	91,9	"	91,5
Almidón, %[f]	99,6	"	98,9

a) 0,5 U P.I. de THERMAMYL/g de s.s. añadido durante la sacarificación

b) Se diluyó con 3 U de MAXAMYL/g de s.s.- 200 ppm en b.s. de Ca^{++}

c) Tratado térmicamente 15 minutos a 121ºC.

d) Corregido a base libre de solubles.

e) No incluye solubles separados en el prelavado

f) Se supone que no hay pérdida de almidón en el prelavado.

TABLA XVIII

CONVERSION DE ALMIDON DE MOLINO LIGERO EMPLEANDO EL PROCEDIMIENTO A 60ºC

Experiencia Nº	GEH-76	GEH-77
Sustancia seca de reposición, %	15,2	15,2
Condiciones de digestión	96 hr a pH 5,5	24 hr a pH 5,5 24 hr a pH 4,3
Análisis de hidrolizados, b.s.		
Sustancia seca	9,3	10,0
Dextrosa, %	93,7	94,4
Proteínas, %	1,5	1,3
N amino, ppm	600	450
Ca^{++}, ppm	33	33
Caudal de filtración, litros/min/m^2	12	14
Análisis de residuos, b.s. a)		
Sustancia seca, %	94,2	93,4
Almidón, %	81,7	81,7
Proteínas, %	14,4	15,4
Solubles, %	Nada	0,2
Solubilización, b.s.		
Total b)	52,7	56,1
Almidón, % c)	58,7	61,7

Condiciones: 15% de almidón de molino lavado.
Convertido con 2 U P.I. de THERMAMYL/g de s.s.
0,25 U GA/g de s.s.

a) Corregido hasta base libre de solubles.

b) No incluye solubles separados en el prelavado.

c) Se supone que no hay pérdida de almidón en el prelavado.

EJEMPLO XII

Sémolas de maíz se convirtieron empleando el procedimiento GS-EHE a 75ºC. Un lote se lavó previamente empleando agua de lago y el segundo empleando una solución de SO_2 al 0,1%. Los resultados se recogen en la Tabla XIX.

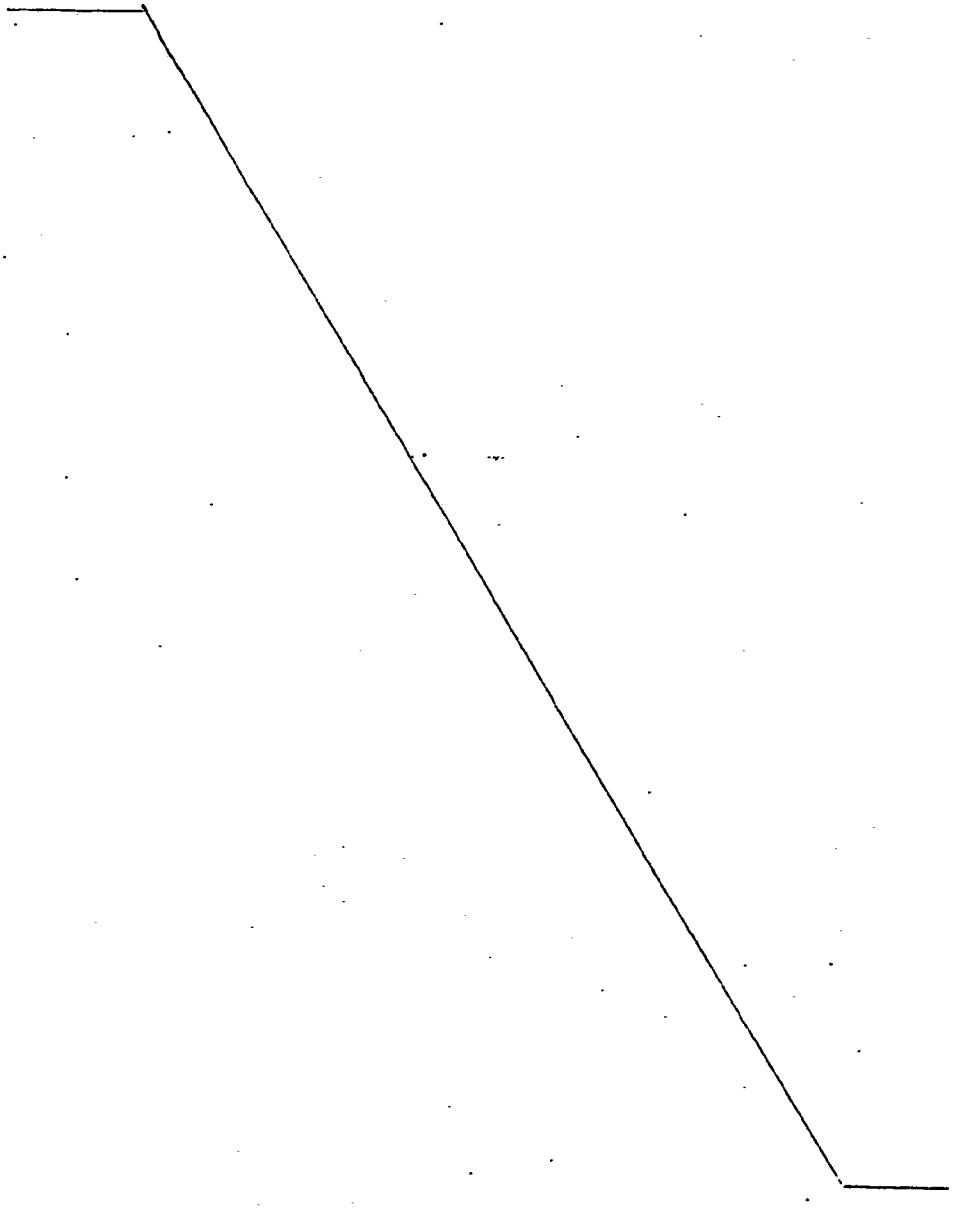

TABLA XIX

COMPARACION DE H_2O Y SO_2 PRELAVANDO SEMOLAS DE MAIZ

Prelavado	H_2O	0,1% SO_2
Solubles de sémola, % en b.s.	2,2	3,4
Análisis de hidrolizado		
% de s.s.	29,44	29,50
Dextrosa, % en b.s.	92,2	95,4
Proteína, % en b.s.	0,25	0,35
N amino, ppm en b.s.	53	112
Ca^{++}, ppm de en b.s.	225	173
Caudal de filtración (litros/min/m^2)	4,3	10,6
Análisis EPC [a]		
% de s.s.	95,8	95,5
Proteínas, % en b.s.	63,3	62,9
Almidón, % en b.s.	13,1	11,0
Solubles, % en b.s.	2,1	1,7
Almidón sin convertir, % b.s. [b]	1,8	1,4

Condiciones: [c] 30% de sémolas (Sémola nº 1 3 Junio 74)
Se diluyó con 1 unidad P.I. de THERMAMYL/g de s.s - pH 6,5 - 200 ppm de Ca^{++}.
Subida de calor programada desde 60ºC hasta 75ºC.
Tratamiento térmico a 100ºC.
Convertido con 0,14 unidades GA/g de s.s - pH 4,3 - 96 horas a 60ºC.

a) Valores corregidos hasta base libre de solubles.

b) Basado en almidón recuperado en EPC; se supone que no hay pérdida en el lavado.

c) Dosificaciones basadas en la sustancia seca de almidón.

EJEMPLO XIII

El almidón original se convirtió en un hidrolizado de almidón soluble por el procedimiento siguiente.

Se preparó una suspensión acuosa al 30% en p/p, se ajustó el pH a 6,2; se añadieron 300 ppm de ion calcio y la suspensión se inoculó con 1,2 U de alfa-amilasa/g de s.s. (MAXAMYL; P/A = 0,9). La suspensión se calentó a 88ºC y se mantuvo durante 2 horas. A continuación se calentó a 127ºC y se mantuvo durante 15 minutos. La suspensión se enfrió luego a 85ºC; se inoculó con 0,6 U de alfa-amilasa/g de s.s. y se mantuvo durante 3 horas.

Esta se enfrió luego a 60ºC, se añadió suficiente agua de lago para reducir el contenido de sólidos al 25% en p/p, se ajustó el pH a 4,3 y la suspensión se inoculó con 0,18 U de glucoamilasa/g de s.s.. Estas condiciones se mantuvieron luego durante 96 horas. El hidrolizado contenía 95,9% de dextrosa, b.s. Un contenido de proteínas de 0,08 % en b.s. y 1,4% de sustancias insolubles totales en b.s.

Aunque la invención se ha descrito junto con sus realizaciones específicas, se comprenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud intenta cubrir cualquier variación, empleos o adaptaciones del invento siguientes, en general, los principios del invento e incluyendo ideas que se originen de la presente descripción que están dentro del conocimiento o práctica habitual en la técnica a la que el invento pertenece y que puede aplicarse a aspectos esenciales aquí recogidos, y que caen dentro del alcance del invento.

REIVINDICACIONES

1ª.- Un procedimiento para la inactivación selectiva de la actividad de enzima proteolítica en una preparación de enzima de alfa-amilasa bacteriana, que comprende las etapas de: (a) introducir en la preparación un material protector; (b) calentar la mezcla resultante a una temperatura en el intervalo de 70ºC a 90ºC; y (c) mantener la temperatura durante un período de tiempo suficiente para inactivar de modo sustancialmente completo la enzima proteolítica sin reducir sustancialmente la actividad de alfa-amilasa.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el pH de la preparación está en el intervalo de 5 a 8.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, en el que la alfa-amilasa bacteriana se produce a partir de un microorganismo Bacillus.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3ª, en el que el microorganismo Bacillus es un microorganismo Bacillus subtilis.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4ª, en el que la temperatura se mantiene durante un período de aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 90 minutos.

6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4ª o la reivindicación 5ª, en el que el material protector es un jarabe de maíz que tiene un E.D. de hasta 50.

7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-

cación 6ª, en el que el jarabe de maíz tiene un contenido de sustancia seca (s.s.) de 20% al 40% en peso.

8ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la cantidad de material protector utilizado es de 0,5 a 2,0 partes por parte en volumen de preparación de enzima.

9ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3ª, en el que el microorganismo Bacillus es un microorganismo Bacillus licheniformis.

10ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9ª, en el que el material protector es una sal de calcio soluble en agua.

11ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10ª, en el que la sal de calcio soluble en agua se emplea en una cantidad para proporcionar una concentración de ion calcio total de 0,5% a 1,5%, en base seca.

12ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9ª a 11ª, en el que la temperatura se mantiene durante un período de 30 minutos a 3 horas.

13ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9ª a 12ª, en el que al menos una parte de dicho ion calcio estaba presente originalmente en dicha preparación de enzima.

14ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 13ª, que comprende la etapa adicional de poner en contacto una suspensión acuosa de un material de almidón con la preparación de alfa-amilasa sustancialmente libre de actividad proteolítica, y mantener la suspensión en condiciones reactivas

durante un período de tiempo para producir un hidrolizado de almidón soluble que contiene menos de 0,5% de materiales de proteína solubles, mientras que cualquier material proteínico permanece en un estado esencialmente insoluble.

15ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14ª, en el que el material de almidón es un material de almidón bruto que se lava previamente antes de la formación de la suspensión acuosa.

16ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15ª, en el que el material de almidón bruto es un material de almidón de maíz molido seco y el prelavado se lleva a cabo por las etapas de: (a) formar una suspensión del material de almidón en una solución acuosa que contiene desde 200 a 1000 ppm de dióxido de azufre; (b) filtrar la suspensión para formar una torta de filtración; y (c) hacer pasar una parte adicional de la solución de dióxido de azufre a través de la torta de filtración.

17ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14ª y 15ª, en el que el material de almidón bruto es un almidón de molino derivado de maíz.

18ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14ª a 17ª, en el que la concentración de la preparación de alfa-amilasa es de 0,1 a 25 unidades de actividad por gramo de material de almidón.

19ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14ª a 18ª, en el que la suspensión acuosa incluye de 5% a 40% en peso de almidón

- en base seca.

20ª.- Un procedimiento para la inactivación selectiva de la actividad de enzima proteolítica en una preparación de enzima de α-amilasa bacteriana.

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

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

Madrid, 16. JUN. 1978

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder

15068
jga