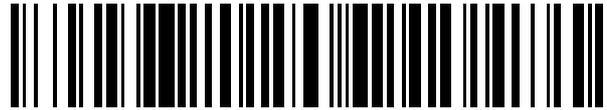


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 623**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)  
**A23L 1/105** (2006.01)  
**A23L 1/238** (2006.01)  
**C12N 9/30** (2006.01)  
**C12N 9/42** (2006.01)  
**C12N 9/58** (2006.01)  
**C12G 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2006 E 06781332 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1908818**

54 Título: **Procedimiento de producción de koji líquido**

30 Prioridad:

**22.07.2005 JP 2005212290**  
**04.10.2005 JP 2005290651**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.11.2014**

73 Titular/es:

**ASAHI BREWERIES, LTD. (100.0%)**  
**23-1, Azumabashi 1-chome, Sumida-ku**  
**Tokyo 130-8602, JP**

72 Inventor/es:

**SUGIMOTO, TOSHIKAZU y**  
**SHOJI, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 521 623 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de koji líquido

**Campo de la técnica**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de koji líquido, específicamente, a un procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad enzimática potenciada.

**Técnica anterior**

10 En cuanto al koji usado en la producción de bebidas alcohólicas uno es el koji sólido, que se cultiva de forma que las esporas de los hongos filamentosos se inoculan en materia prima que se ha tratado con cocción y similares, y koji líquido, que se cultiva de forma que el medio líquido se prepara añadiendo materia prima y otras fuentes de nutrientes a agua y, después se inoculan esporas de hongos koji o micelios precultivados de mohos koji y similares.

15 En la producción convencional de alimentos y bebidas fermentados, tales como bebidas alcohólicas, incluyendo, por ejemplo, sake, shochu, salsa de soja, pasta de soja fermentada, sake dulce y similares, lo que se denomina koji sólido, que se prepara con el procedimiento de cultivo sólido, se ha usado ampliamente. El procedimiento de cultivo sólido es el procedimiento de cultivo en el que las esporas de mohos koji, tales como *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* y similares, se dispersan sobre materia bruta sólida, tal como cereales cocinados al vapor, para permitir el crecimiento de los mohos koji sobre la superficie sólida.

20 Por ejemplo, en la producción de shochu, el koji sólido, tal como *Aspergillus kawachii* y *Aspergillus awamori*, se ha usado ampliamente. No obstante, dado que el procedimiento de cultivo sólido es un sistema de cultivo en el que las materias primas y los mohos koji se dispersan de forma no homogénea, es difícil uniformar los factores tales como la temperatura, el contenido en agua y varias composiciones nutrientes, y el procedimiento de cultivo sólido es muy complicado en el control de cultivo. Además, la producción de koji a menudo se realiza en condiciones abiertas y se requiere precaución en términos de control de calidad para prevenir la contaminación con otras bacterias. Por tanto, el procedimiento de cultivo sólido no es adecuado para la producción a gran escala.

25 Por el contrario, el procedimiento de cultivo líquido es fácil en el control del cultivo y el control de calidad, por lo que es adecuado para una producción eficiente. No obstante, debido a la razón de que, por ejemplo, la actividad enzimática es insuficiente para fermentar shochu, el producto de cultivo obtenido mediante cultivo de mohos koji rara vez se usa como koji shochu. El producto de cultivo obtenido mediante el procedimiento de cultivo líquido puede ser un producto de cultivo obtenido mediante el procedimiento de cultivo líquido (en lo sucesivo en el presente documento también denominado "koi líquido"), así como líquido de cultivo, células y un concentrado de los mismos, o un producto desecado de los mismos.

30 Además de las razones mencionadas anteriormente, un motivo fundamental de que no se use el producto de cultivo obtenido con el procedimiento de cultivo líquido para producir alimentos y bebidas fermentados tales como shochu es que se sabe que el comportamiento de los mohos koji para producir enzimas, tales como amilasa y celulasa en el cultivo líquido, es muy diferente del del cultivo sólido y su productividad también se sabe que es mala en general (véanse los documentos no de patente 1 y 2).

35 En la producción de las bebidas alcohólicas tales como shochu, el alcohol normalmente se genera mediante sacarificación y fermentación simultáneas. Por tanto, las enzimas sacarolíticas de los mohos koji, que afecta al suministro de glucosa a los mohos koji, en particular glucoamilasa y la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido son enzimas clave en la fermentación alcohólica. No obstante, se sabe que la actividad de la glucoamilasa es considerablemente baja en el producto de cultivo obtenido con el procedimiento de cultivo líquido y su comportamiento de producción también es muy diferente del del cultivo sólido (véanse los documentos no de patente 3 a 6).

40 Como procedimiento de mejora de la actividad glucoamilasa de los mohos koji, se ha notificado el procedimiento de cultivo de mohos koji destacando el crecimiento de micelios (véase el documento de patente 1) y el procedimiento de añadir cereales tostados al fluido de cultivo del moho koji (véase el documento de patente 2). El procedimiento divulgado en el documento de patente 1 produce cultivo sobre la membrana porosa o en agente de inmovilización que tiene huecos de aire para permitir la expresión del gen nuevo glaB que codifica la glucoamilasa para potenciar de este modo la actividad enzimática.

45 De acuerdo con lo anterior, el procedimiento requiere un control estricto o dispositivos de cultivo específicos y, por tanto, no es práctico. El procedimiento divulgado en el documento de patente 2, los cultivos de mohos koji en medio líquido usando cereales tostados como, al menos, una porción de la materia prima, que requiere una etapa de producción adicional de tostar cereales.

50 Los inventores de la presente invención proporcionaron una invención relacionada con un procedimiento de cultivar mohos koji usando medio líquido que contiene los sacáridos que los mohos koji apenas descomponen (véase el documento de patente 3). Cultivando los mohos koji en líquido con la invención, un producto de cultivo del moho koji

que tiene una actividad elevada de las enzimas glicolíticas tales como glucoamilasa, que se pueden usar para producir alimentos y bebidas fermentados tales como sake, se puede obtener de forma conveniente y económica,

5 Por otro lado, recientemente, se ha realizado el análisis biológico molecular en  $\alpha$ -amilasa estable en ácido hasta los detalles (véase el documento no de patente 7). El análisis se ha notificado del siguiente modo: Un moho koji blanco tiene dos genes de amilasa diferentes que son responsables, respectivamente, de dos características diferentes, es decir  $\alpha$ -amilasa inestable en ácido y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido. Los comportamientos de expresión de los respectivos genes son muy diferentes entre sí. En el cultivo líquido, la -amilasa inestable en ácido se produce de forma suficiente, mientras que la -amilasa estable en ácido, una enzima clave para fermentar shochu, apenas se produce.

10 Para producir shochu, la fermentación se realiza en condiciones de pH bajo para prevenir la putrefacción de la pasta de malta de shochu. La amilasa inestable en ácido contribuye muy poco a la glicólisis en la fermentación del shochu porque se desactiva muy rápido en condiciones de pH bajo. Por tanto, es indispensable para producir shochu que la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido se produzca con un rendimiento elevado, que se piensa que contribuye a la glicólisis en la fermentación del shochu, mediante cultivo líquido de mohos koji.

15 El comportamiento de producción de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido en cultivo líquido de mohos koji se ha investigado con detalle y se ha publicado. No obstante, el procedimiento usa medio sintético que contiene peptona y solución tampón de citrato, y requiera un tiempo de cultivo de 100 horas o más, por lo que sería difícil aplicarlo a la actual fermentación de shochu (véanse los documentos no de patente 8 a 10).

20 Como se ha descrito anteriormente, se piensa, en general, que la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido es la enzima que no se puede producir básicamente cultivando en líquido y, por tanto, no se ha desarrollado koji líquido que tenga una actividad elevada de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido.

25 Se ha divulgado un procedimiento para producir arroz malteado líquido que tiene una concentración elevada de alcohol de azúcar (véase el documento de patente 4). Se ha preparado un fluido de cultivo de moho sumergido para pasta de malta de de vinagre de arroz (véase el documento no de patente 11). Se ha investigado el efecto de las variaciones de cultivo y nutritivos sobre determinadas exoenzimas secretadas por los hongos (véase el documento no de patente 12).

Documento de de patente 1: JP 11-225746 A

Documento de de patente 2: JP 2001-321154 A

Documento de de patente 3: JP 2003-265165 A

30 Documento de de patente 4: JP 2003-047455 A

Documento no de patente 1: Iwashita K. et al: Biosci.

Documento no de patente 1: Iwashita K. et al: Biosci. Biotechnol. Bioche., 62, 1938-1946(1998)

Documento no de patente 2: Yuichi Yamane et al.: Journal of the Brewing Society of Japan, 99, 84-92(2004)

Documento no de patente 3: Hata Y. et al. : J. Ferment. Bioeng. , 84, 532-537 (1997)

35 Documento no de patente 4: Hata Y. et al. : Gene., 207, 127-134 (1998)

Documento no de patente 5: Ishida H. et al.: J. Ferment. Bioeng. , 86, 301-307 (1998)

Documento no de patente 6: Ishida H. et al.: Curr. Genet., 37, 373-379 (2000)

Documento no de patente 7: Nagamine K. et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem, 67, 2194-2202 (2003)

Documento no de patente 8: Sudo S. et al.: J. Ferment. Bioeng. , 76, 105-110 (1993)

40 Documento no de patente 9: Sudo S. et al.: J. Ferment. Bioeng. , 77, 483-489 (1994)

Documento no de patente 10: Shigetoshi Sudo et al. : Journal of the Brewing Society of Japan, 89, 768-774(1994)

Documento no de patente 11: Wadaka, H., et al.: Hiroshima-ken Shokuhin Kogyo Shikenjo Kenkyu Hokoku, 15, 13-19 (1980)

45 Documento no de patente 12: Sreekantiah, K.R., et al.: Chem. Mikrobiol. Technol Lebensm., 2, 42-48 (1973)

**Divulgación de la invención**

**Problemas a resolver por la invención**

5 Los inventores de la presente invención han encontrado que el koji líquido que tiene actividad suficiente de enzimas tales como glucoamilasa,  $\alpha$ -amilasa estable en ácido y similares, que son necesarios para producir shochu y similares, se puede producir cultivando mohos koji en medio líquido que contiene los cereales cuya superficie está completa o parcialmente cubierta con cáscaras, como materia prima de cultivo, y ya se han presentado la solicitud de patente (véase, las memorias de la solicitud de patente JP N° 2004-350661 y la solicitud de patente JP N° 2004-352320).

No obstante, sigue siendo desconocido el comportamiento de producción de las enzimas a excepción de glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido en estos procedimientos.

10 Un objeto de la presente invención es desarrollar un procedimiento de potenciar la actividad enzimática de las enzimas amilolíticas tales como glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido y las otras enzimas en koji líquido. Para ser específicos, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de producir koji líquido que tenga una actividad enzimática elevada optimizando la composición del medio líquido.

**Medios para resolver el problema**

15 Con el fin de conseguir una producción más alta de enzimas en koji líquido, los inventores de la presente invención han realizado extensos estudios sobre los efectos de combinación de las materias primas de cultivo mencionadas anteriormente y varias fuentes de nutrientes y se ha hallado que la productividad de la glucoamilasa que es una enzima amilolítica, la celulasa que es una enzima celulolítica y la carboxipeptidasa ácida que es una enzima proteolítica se puede mejorar incorporando una fuente de nitrógeno específica en el medio líquido y permitiendo  
20 adicionalmente que la fuente de nitrógeno coexista con al menos uno de un sulfato y un fosfato y, por tanto, han completado la invención.

Es decir, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas, comprendiendo el procedimiento cultivar mohos koji blanco y/o mohos koji negro en un medio líquido que contiene (i) un cereal cuya superficie está completamente  
25 cubierta con cáscaras y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en nitrato potásico, nitrato sódico, células de levadura, productos tratados de células de levadura, cáscaras de cereales y salvado de cereal.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas de acuerdo con el primer aspecto, en el que las enzimas  
30 comprenden glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con el primer aspecto, en el que el medio líquido contiene un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscaras; al menos una fuente de nitrógeno  
35 seleccionado del grupo que consiste en nitrato potásico y nitrato sódico; al menos una sal fosfato seleccionada del grupo que consiste en dihidrógenofosfato potásico y fosfato amónico; y al menos una sal sulfato seleccionada del grupo que consiste en sulfato magnésico heptahidrato, sulfato de hierro heptahidrato y sulfato amónico.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con el tercer aspecto, en el que el medio líquido contiene la al menos una fuente de nitrógeno en una concentración de 0,1 a 2,0% (en peso/volumen).

40 De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con el tercer aspecto, en el que el medio líquido contiene la al menos una sal fosfato en una concentración de 0,05 a 1,0% (en peso/volumen).

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con el tercer aspecto, en el que el medio líquido  
45 contiene la al menos una sal sulfato en una concentración de 0,01 a 0,5% (en peso/volumen).

De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas de acuerdo con el primer aspecto, en el que el cereal comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en arroz crudo, arroz con todas las glumas, arroz con parte de las cáscaras y cebada que tiene una relación de pulido no inferior al 93%.

50 De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas de acuerdo con el primer aspecto, en el que los mohos koji comprenden *Aspergillus kawachii*.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con el primer aspecto, en el que los mohos koji negro

comprenden al menos uno seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.

De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas de acuerdo con el primer aspecto, en el que el cereal comprende cebada.

- 5 De acuerdo con un undécimo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de producir al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido, que comprende producir la al menos una enzima cultivando mohos koji blanco y/o mohos koji negro en un medio líquido contiene (i) un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscaras y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionado del grupo que consiste en nitrato potásico, nitrato sódico, células de levadura, productos tratados de células de levaduras, cáscaras de cereales y salvado de cereales.

- 10 De acuerdo con un duodécimo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de producir al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en glucoamilasa,  $\alpha$ -amilasa estable en ácido, celulasa y carboxipeptidasa ácida que comprende producir la al menos una enzima cultivando mohos koji blanco y/o mohos koji negro en un medio líquido que contiene un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscaras; al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en nitrato potásico y nitrato sódico; al menos una sal fosfato seleccionada del grupo que consiste en dihidrógenofosfato de potasio y fosfato amónico; y al menos una sal sulfato seleccionada del grupo que consiste en sulfato de magnesio heptahidrato, sulfato de hierro heptahidrato y sulfato amónico.

- 15 De acuerdo con un decimotercer aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir encimas de acuerdo con el duodécimo aspecto, en el que el medio líquido contiene la al menos una fuente de nitrógeno en una concentración de 0,1 a 2,0% (en peso/volumen).

De acuerdo con un decimocuarto aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir encimas de acuerdo con el duodécimo aspecto, en el que el medio líquido contiene la al menos una sal fosfato en una concentración de 0,05 a 1,0% (en peso/volumen).

- 20 De acuerdo con un decimoquinto aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir encimas de acuerdo con el duodécimo aspecto, en el que el medio líquido contiene la al menos una sal sulfato en una concentración de 0,01 a 0,5% (en peso/volumen).

- 25 De acuerdo con un decimosexto aspecto de la invención se proporciona el procedimiento de producir enzimas de acuerdo con el undécimo aspecto, en el que el cereal comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en arroz crudo, arroz con todas las glumas arroz con parte de las glumas y cebada que tiene una relación de pulido no inferior al 93%.

De acuerdo con un decimoséptimo aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir enzimas de acuerdo con el undécimo o duodécimo aspecto, en el que los mohos koji blanco comprenden *Aspergillus kawachii*.

- 30 De acuerdo con un decimoctavo aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir enzimas de acuerdo con el undécimo o duodécimo aspecto, en el que los mohos koji negro comprenden al menos uno seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.

De acuerdo con un decimonoveno aspecto de la presente invención se proporciona el procedimiento de producir enzimas de acuerdo con el undécimo o duodécimo aspecto, en el que el cereal comprende cebada.

40 **Efecto de la invención**

- De acuerdo con la presente invención, una sustancia orgánica y/o una sustancia inorgánica específica como fuente de nitrógeno se añaden al medio líquido que contiene el cereal cuya superficie está completa o parcialmente cubierta con cáscaras como materia prima del cultivo, se añaden además una sal sulfato y una sal fosfato y los mohos koji se cultivan en el medio líquido, no solo para mejorar considerablemente la productividad de las enzimas amilolíticas en koji líquido sino también para producir koji líquido que contiene enzimas celulolíticas y enzimas proteolíticas con un rendimiento elevado. Además, se piensa que la productividad de las enzimas producidas por los mohos koji generalmente mejora incluso más que las encimas mencionadas anteriormente.

- 50 Cuando se producen alimentos y bebidas fermentados como el shochu usando el koji líquido producido de acuerdo con la presente invención se realiza una buena fermentación debido a la disminución de la viscosidad de la pasta de malta por la elevada actividad de las enzimas celulolíticas, de modo que se puede esperar un incremento del rendimiento de alcohol. Además, la producción de aminoácidos aumenta debido a la elevada actividad de las enzimas proteolíticas, de modo que se pueden producir alimentos y bebidas fermentadas que tengan un sabor maravilloso.

Adicionalmente, el cultivo líquido se puede controlar estrictamente en comparación con el cultivo sólido, de modo

que se puede producir koji líquido con calidad de estabilidad con bajos costes.

Además, los cereales usados en la presente invención están sin pulir o pulidos en la medida en que al menos las cáscaras permanecen sobre la superficie. Por tanto se puede esperar una mejora de la disponibilidad de la materia prima y en el rendimiento.

5 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 muestra actividades de la glucoamilasa y de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos cada uno cultivando con el medio líquido usando nitrato potásico como fuente de nitrógeno. Las barras negras representan cada una la actividad de la glucoamilasa (U/ml) y las barras blancas representan cada una la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (U/ml).

10 La FIG. 2 muestra actividades de la glucoamilasa y de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos cada uno cultivando con el medio líquido usando una sustancia de nitrógeno inorgánico y una sal inorgánica. Las barras negras representan cada una la actividad de la glucoamilasa (U/ml) y las barras blancas representan cada una la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (U/ml).

15 La FIG. 3 muestra actividades de la glucoamilasa y de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos cada uno cultivando con el medio líquido usando células de levadura o autolisado de levadura como fuente de nitrógeno.. Las barras negras representan cada una la actividad de la glucoamilasa (U/ml) y las barras blancas representan cada una la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (U/ml).

20 La FIG. 4 muestra actividades de la glucoamilasa y de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos cada uno cultivando con el medio líquido usando una combinación de una sustancia de nitrógeno inorgánico, una sal inorgánica y células de levadura. Las barras negras representan cada una la actividad de la glucoamilasa (U/ml) y las barras blancas representan cada una la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (U/ml).

25 La FIG. 5 muestra actividades de la glucoamilasa y de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos cada uno cultivando con el medio líquido usando una combinación de salvado de cebada, células de levadura y una sustancia de nitrógeno inorgánico como fuente de nitrógeno. Las barras negras representan cada una la actividad de la glucoamilasa (U/ml) y las barras blancas representan cada una la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (U/ml).

30 La FIG. 6 muestra actividades de la glucoamilasa y de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos cada uno cultivando con el medio líquido usando una combinación de cáscaras de cebada y células de levadura como fuente de nitrógeno. Las barras negras representan cada una la actividad de la glucoamilasa (U/ml) y las barras blancas representan cada una la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido. (U/ml)

La FIG. 7 muestra las actividades de varias enzimas de productos de cultivo de mohos koji obtenidas cada una cultivando con el medio líquido usando una sal sulfato, una sal nitrato y una sal fosfato. De (A) a (D) muestran, respectivamente, las actividades (U/ml) de la glucoamilasa (GA), la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA), la celulosa (CEL) y la carboxipeptidasa ácida (ACP).

35 **Mejores realizaciones para llevar a cabo la invención**

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle.

El procedimiento de producir koji líquido de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de cultivar mohos koji en el medio líquido preparado añadiendo al mismo materias primas tales como cereales y fuentes de nitrógeno para producir koji líquido con una actividad enzimática potenciada.

40 Más específicamente, en la presente invención los mohos koji se cultivan con el medio líquido que contiene los cereales cuya superficie está completamente cubierta por cáscaras y, por tanto, requiere tiempo para sacarificar los almidones en los cereales, la tasa de liberación de los sacáridos en el sistema de cultivo se suprime, de modo que se potencia la actividad enzimática del koji líquido. Adicionalmente, los mohos koji producen considerablemente diversas enzimas porque el medio líquido contiene fuentes de nutrientes específicas.

45 En el presente documento, ejemplos de la enzima que van a producir los mohos koji comprenden, aunque no necesariamente se imitan a ellos, una enzima amilolítica tal como glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa, una enzima celulolítica tal como celulasa y  $\beta$ -glucosidasa, y una enzima proteolítica, tal como la carboxipeptidasa ácida y la proteasa ácida.

50 En la presente invención, ejemplos del cereal que se va a usar como materia prima de cultivo comprenden cebada, arroz, trigo, trigo sarraceno, mijo japonés, mijo cola de zorro, mijo, kaoliang, maíz y similares. Cada una de las materias primas de cultivo tiene que tener una forma tal que su superficie esté completamente cubierta por cáscaras. Se puede usar un material sin pulir o que tenga una relación de pulido igual o superior a la cual se ha pulido de modo que las cáscaras permanecen al menos sobre la superficie de las pulpas, y también se puede usar arroz crudo, cebada cruda y similares. En el caso del arroz, se puede usar arroz crudo, arroz con todas las glumas y arroz con parte de las glumas.

Por ejemplo, cuando el cereal es cebada, se puede usar material sin pulir que tenga una relación de pulido del 100% o siempre que la relación de pulido del material sin pulir se defina como del 100%, teniendo el material la relación de pulido determinada restando la relación de las cáscaras de la cebada (generalmente de 7 a 8%) de la relación de pulido del material sin pulir, es decir que tenga una relación de pulido no inferior al 93%.

5 En el presente documento, la expresión "relación de pulido" hace referencia al porcentaje que permanece después de pulir los cereales. Por ejemplo, el término "relación de pulido del 90% significa que el 10% de las cáscaras o similares sobre la porción de la capa superficial de los cereales se ha eliminado. En la presente invención, además, la expresión "cebada cruda" comprende las relaciones entre la cebada sin pulir y la cebada pulida que tiene cáscaras que permanecen en las superficies de las pulpas, es decir, el material que tiene una relación de pulido del  
10 90% o superior. Además, el término "cáscaras" hace referencia a la parte externa que cubre la superficie de una partícula de cereal.

Una cualquiera de las materias primas de cultivo mencionadas anteriormente se usa sola o dos o más de ellas se usan en combinación para preparar el siguiente medio líquido. Es decir, el cereal como materia prima de cultivo se mezcla con agua en combinación con la fuente de nitrógeno descrita en el presente documento más adelante para preparar el medio líquido. Una proporción de mezcla del cereal se ajusta en la medida en que las enzimas, como una enzima amilolítica, una enzima celulolítica y una encima proteolítica se generan de forma selectiva y se acumulan en el producto de cultivo de los mohos koji.

Por ejemplo, cuando se usa cebada como materia prima, el medio líquido se prepara añadiendo al agua de 1 a 20% (en peso/volumen) de la cebada bruta. Cuando se usa cebada sin pulir como cebada cruda, más preferentemente se prepara medio líquido con la adición de 8 a 10% (en peso/volumen). Cuando se usa cebada pulida al 95% como cebada cruda como materia prima, más preferentemente se prepara medio líquido con la adición de 1 a 4% (en peso/volumen).

Además, cuando se usa arroz crudo del que se han eliminado las glumas como materia prima de cultivo, el medio líquido se prepara añadiendo de 1 a 20% (peso/volumen) del arroz crudo respecto a agua, preferentemente de 5 a 13% (peso/volumen), más preferentemente de 8 a 10% (peso/volumen).

Cuando se usan los otros cereales, el medio líquido se prepara del mismo modo añadiendo de 1 a 20% (peso/volumen) de los cereales respecto al agua.

De este modo, la cantidad de mezcla más adecuada varía en función de los grados de pulido de la materia prima que se van a usar, las cepas de koji que se van a usar, los tipos de materia prima y similares, por tanto, se puede seleccionar adecuadamente considerando estos factores.

Cuando la cantidad de la materia prima de cultivo usada supera el valor del límite superior, la viscosidad del medio de cultivo aumenta y el suministro de oxígeno o aire necesario para cultivar en aerobiosis los mohos koji se hace insuficiente para permitir el progreso del cultivo, por lo que no se prefiere. Por otro lado, cuando la cantidad de la materia prima usada no satisface el valor del límite inferior, las enzimas deseables no se pueden producir con un rendimiento elevado.

Los almidones incluidos en la materia prima de cultivo se pueden gelatinizar antes de cultivar. Un procedimiento de gelatinizar almidones no está particularmente limitado y puede realizarse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos convencionales que comprenden el procedimiento de cocción y el procedimiento de tostado. En la etapa de esterilizar el medio líquido como se describe más adelante, si los almidones se calientan hasta la temperatura de gelificación o más alta mediante esterilización a temperaturas altas y a presiones altas, la gelatinización de los almidones se realiza simultáneamente mediante dicho tratamiento.

En el medio líquido, una sustancia orgánica, una sustancia inorgánica y similares se incluyen como fuente de nitrógeno además de la materia prima de cultivo mencionada anteriormente. La fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en nitrato potásico, nitrato sódico, células de levadura, productos tratados de células de levadura (tales como células de levadura descompuestas, extractos de levadura y similares), cáscaras de cereales y salvado de cereales. El nitrato potásico es particularmente preferido.

Una cualquiera de las fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o dos o más de las sustancias orgánicas y/o las sustancias inorgánicas se pueden usar en combinación.

La cantidad a añadir de la fuente de nitrógeno no es particularmente limitada siempre que se estimule el crecimiento de los mohos koji, no obstante de 0,1 a 2% (peso/volumen), preferentemente de 0,5 a 1,0% (peso/volumen) como sustancia orgánica y la cantidad a añadir de la sal nitrato como sustancia inorgánica es de 0,05 a 2,0% (peso/volumen), preferentemente de 0,1 a 2,0% (peso/volumen), más preferentemente de 0,1 a 1,5% (peso/volumen).

La adición de la fuente de nitrógeno en una cantidad superior al límite superior no es preferible porque el crecimiento de los mohos koji está inhibido. Por otro lado, una cantidad a añadir de la fuente de nitrógeno inferior al valor del límite inferior tampoco es preferible porque no se estimula la producción de enzima.

5 Ejemplos de la levadura a usar como un tipo de fuente de nitrógeno en la presente invención comprenden levadura de cerveza, levadura de vino, levadura de güisqui, levadura de shochu, levadura de sake y levadura de pan, que se usan en procesos de fermentación o producción de alimentos y las células de levadura de los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Saccharomycopsis*, *Saccharomycodes*, *Pichia*, *Pachysolen* y similares.

10 Las células de las propias levaduras se pueden usar como fuente de nitrógeno y también se pueden usar en forma de células de levadura descompuesta o extractos de levadura. Las células de levadura descompuesta o el extracto de levadura se pueden obtener sometiendo las células de levadura a tratamientos tales como el procedimiento de autólisis (procedimiento de solubilización de las células usando enzimas proteolíticas que existen originalmente en las células de levadura), el procedimiento de enzimólisis (procedimiento de solubilización con la adición de una preparación enzimática o similar derivado de microorganismos o plantas), el procedimiento de extracción en agua caliente (procedimiento de solubilizar sumergiendo las células de levadura en agua caliente durante un periodo determinado de tiempo), el procedimiento de descomposición ácida o alcalina (procedimiento de solubilización con la adición de varios ácidos o bases), el procedimiento de triturado físico (procedimiento de triturar con el tratamiento de ultrasonidos y el procedimiento de homogeneización a presión alta o mezclando con sólidos tales como esferas de cristal y agitando) y el procedimiento de congelación-descongelación (procedimiento de trituración congelando y descongelando al menos una vez).

20 Además, el salvado de los cereales, tales como salvado de arroz, que es un subproducto obtenido del pulido de los cereales, también se puede usar como fuente de nitrógeno. Una semilla de cereales se descompone de una porción de la testa, una porción del embrión, una porción del endospermo y la gluma que los protege. El salvado es una porción compuesta por el embrión y la porción de la testa.

25 Adicionalmente, en la presente invención, las cáscaras de cereal, es decir una porción de testa de los cereales, se pueden usar como fuente de nitrógeno y generalmente se usan cáscaras de cereales del mismo tipo de cereal usado como materia prima de cultivo. El salvado de cereal y las cáscaras de cereal se pueden usar en combinación con las otras fuentes de nitrógeno.

En el medio líquido que se va a usar en la presente invención se puede usar una sal sulfato y una sal fosfato además de la materia prima de cultivo y las fuentes de nitrógeno como se ha descrito anteriormente. Usando dichas sales inorgánicas en combinación, se hace posible potenciar la actividad enzimática de una enzima amilolítica, una enzima celulolítica, una enzima proteolítica y similares.

30 Ejemplos de la sal sulfato comprenden sulfato de magnesio heptahidrato, sulfato de hierro heptahidrato y sulfato amónico, y específicamente se prefiere el sulfato de magnesio heptahidrato. Ejemplos de la sal fosfato comprenden dihidrógenofosfato potásico y fosfato amónico, siendo específicamente preferible el dihidrógenofosfato potásico.

Una cualquiera de dichas sales inorgánicas se pueden usar solas o dos o más de ellas se pueden usar en combinación.

35 Además, la concentración de las sales inorgánicas en medio líquido se ajusta en la medida en que las enzimas, como una enzima amilolítica, una enzima celulolítica y una encima proteolítica, se generan de forma selectiva y se acumulan en el producto de cultivo de los mohos koji. Por ejemplo, la concentración de la sal sulfato es de 0,01 a 0,5%, preferentemente de 0,02 a 0,1%, y la concentración de la sal fosfato es de 0,05 a 1,0%, preferentemente de 0,1 a 0,5%, siempre que cada valor esté en peso/volumen.

40 Las sales inorgánicas mencionadas anteriormente se pueden usar solas o dos o más de ellas se pueden usar en combinación.

45 Al medio líquido se puede añadir opcionalmente una sustancia orgánica y una sal inorgánica aparte de la fuente de nitrógeno mencionada anteriormente y la sal inorgánica como fuente de nutrientes. Los aditivos no están particularmente limitados, siempre que se usen las sustancias que generalmente se usan para cultivar mohos koji. Ejemplos de la sustancia orgánica comprenden salvado de trigo, licor de maceración del maíz, una torta de soja y soja desgrasada. Ejemplos de la sal inorgánica comprenden compuestos hidrosolubles tales como una sal de amoníaco, una sal de potasio, una sal de calcio, una sal de magnesio y similares. Dos o más sustancias orgánicas y/o sales inorgánicas se pueden usar al mismo tiempo.

50 La cantidad a añadir de las mismas no está particularmente limitada siempre que se facilite el crecimiento de los mohos koji. La cantidad a añadir de la sustancia orgánica es, preferentemente, de aproximadamente 0,1 a 5% (peso/volumen) y la cantidad a añadir de la sal inorgánica es, preferentemente, de aproximadamente 0,1 a 1% (peso/volumen).

55 La adición de la fuente de nutrientes en una cantidad superior al límite superior no es preferible porque el crecimiento de los mohos koji está inhibido. Por otro lado, una cantidad a añadir de la fuente de nutrientes inferior al valor del límite inferior tampoco es preferible porque no se estimula la producción de enzima.

El medio líquido para los mohos koji obtenidos mezclando la materia prima de cultivo mencionada anteriormente y la

fuentes de nitrógeno con agua pueden someterse opcionalmente a un tratamiento de esterilización y el procedimiento de tratamiento no está particularmente limitado. Un ejemplo del procedimiento comprende el procedimiento de esterilización a alta temperatura y a presión elevada y, en este caso, la esterilización se puede realizar a 121 °C durante 15 minutos.

- 5 El medio líquido esterilizado se enfría hasta una temperatura de cultivo y, después, se inoculan en el medio líquido mohos koji blancos y/o mohos koji negros.

Ejemplos de los mohos koji que se van a usar en la presente invención comprenden, preferentemente, mohos koji capaces de producir enzimas amilolíticas tales como glucoamilasa,  $\alpha$ -amilasa estable en ácido y  $\alpha$ -amilasa, enzimas celulolíticas tales como celulasa y  $\beta$ -glucosidasa, y enzimas proteolíticas tales como carboxipeptidasa ácida y proteasa ácida. Ejemplos específicos de los mohos koji comprenden mohos koji blancos tales como *Aspergillus kawachii* y mohos koji negros tales como *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.

La forma de los mohos koji que se van a inocular en el medio es arbitraria y se puede usar una cualquiera de las esporas y los micelios de los mohos koji.

15 Dichos mohos koji se pueden usar para el cultivo de una sola cepa o para el cultivo mixto con dos o más cepas homólogas o heterólogas. Se permite usar cualquier forma de las esporas o los micelios obtenidos en precultivo. No obstante, preferentemente se usan los micelios porque se requiere un periodo de tiempo más corto para la fase de crecimiento logarítmica.

20 La cantidad de los mohos koji inoculada en el medio líquido no está particularmente limitada pero el número de las esporas puede estar en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  por ml del medio líquido. Para los micelios, preferentemente se inoculan de aproximadamente 0,1 a 10% del líquido precultivo.

La temperatura de cultivo de los mohos koji es, preferentemente, de 25 a 45 °C, más preferentemente de 30 a 40 °C, pero no particularmente limitada siempre que el crecimiento no se vea afectado de forma adversa. Si la temperatura de cultivo es baja, tiende a contaminarse con microbios infecciosos a medida que el crecimiento de los mohos koji se ralentiza. Por tanto, el tiempo de cultivo está adecuadamente en el intervalo de 24 a 72 horas.

25 El aparato de cultivo puede ser cualquiera de los capaces de llevar a cabo un cultivo líquido. Los mohos koji tienen que cultivarse aeróbicamente. Por tanto, el cultivo deberá realizarse en condiciones aeróbicas en las que se puede suministrar oxígeno o aire al medio. Además, es preferible agitar el medio de forma que las materias primas, el oxígeno y los mohos koji puedan distribuirse de forma uniforme en el aparato durante el cultivo. Las condiciones de agitación y la cantidad de aireación se pueden efectuar en cualquier condición siempre que se mantenga un ambiente de cultivo aerobio y, por tanto, se pueden seleccionar adecuadamente en función del aparato de cultivo, la viscosidad del medio y similares.

30 Cultivando con el procedimiento de cultivo anterior, se pueden producir cantidades altas de enzimas tales como una enzima amilolítica, una enzima celulolítica y una enzima proteolítica y similares. Como resultado se obtiene koji líquido con la actividad enzimática para usar en la fermentación de shochu.

35 El koji líquido producido de acuerdo con la presente invención comprende el fluido de cultivo obtenido a partir del producto del cultivo mediante separación por centrifugación y similares, el concentrado del mismo, el producto desecado del mismo y similares, así como el propio producto del cultivo.

40 Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con el procedimiento de cultivo descrito anteriormente se pueden producir cantidades elevadas de las enzimas, tal como una enzima amilolítica, una enzima celulolítica y una enzima proteolítica.

Por tanto, el procedimiento de producción de una enzima descrito en el undécimo aspecto de la presente invención es el mismo que el procedimiento de producción de koji líquido descrito anteriormente.

45 El koji líquido obtenido mediante el procedimiento de producción de la presente invención se puede usar adecuadamente en la producción de bebidas y alimentos fermentados tales como shochu. El koji líquido se puede usar en lugar del koji sólido, por ejemplo, en el caso de la fabricación de sake, en la etapa de preparación de levaduras o pasta de malta; en el caso de la fabricación de shochu, en la etapa de preparación de la pasta de malta; en el caso de la fabricación de salsa de soja, en la etapa de acumulación; en el caso de la fabricación de miso, en la etapa de preparación; en el caso de la fabricación de sake dulce, en la etapa de preparación; y en el caso de la fabricación de amazake, en la etapa de preparación.

50 Además, una parte del koji líquido resultante se puede usar como iniciador para la posterior producción de koji líquido. Produciendo koji líquido continuamente de este modo se puede conseguir una producción estable y se puede mejorar la eficiencia de la producción al mismo tiempo.

Cuando las bebidas y los alimentos fermentados, como el shochu, se producen usando el koji líquido mencionado anteriormente se pueden llevar a cabo todas las etapas en la fase líquida. Un procedimiento de producir bebidas y

alimentos fermentados en fase líquida a través de las etapas completa, por ejemplo, cuando se produce shochu, es que el maíz, el trigo, el arroz, la patata, la caña de azúcar y similares como materias primas se calientan a aproximadamente 80°C para que se licuen disolviendo con una preparación enzimática resistente al calor, el koji líquido anterior y la levadura se añaden a la misma para permitir la fermentación alcohólica de la pasta de malta y, después, se destila a presión normal o a presión reducida y similares.

El koji líquido obtenido mediante el procedimiento de la presente invención tiene una actividad enzimática elevada, de modo que el koji líquido se puede usar para una preparación enzimática y una sustancia farmacéutica tal como un agente digestivo. En este caso, el producto de cultivo resultante de los mohos koji se puede concentrar y purificar en una medida deseada para formar una formulación añadiendo un excipiente, un agente espesante, un edulcorante adecuados y similares.

Además, usando una región promotora del gen de la enzima amilolítica y similares de los mohos koji se puede producir abundante heteroproteína deseable en el producto de cultivo de los mohos koji.

### Ejemplos

Aunque la presente invención se describirá más específicamente en el presente documento más adelante con referencia a los ejemplos y similares, la presente invención no está limitada a estos ejemplos y similares.

#### Ejemplo 1

##### Adición de sustancia de nitrógeno inorgánico en la producción de koji líquido

El efecto cuando se añadió al medio líquido nitrato potásico como sustancia de nitrógeno inorgánico se investigó como se describe a continuación.

En primer lugar se prepararon tres tipos de medios líquidos en los que se añadió cebada cruda, respectivamente, a agua sin adición (control), y con 0,2% (peso/volumen) de nitrato potásico y con 0,4% (peso/volumen) de nitrato potásico de forma que la cantidad de cebada cruda se ajustó a un 2% (peso/volumen).

Cada 100 ml del medio líquido se introdujo en un matraz Erlenmeyer de fondo reflectado de 500 ml y se introdujo en la autoclave, y se inocularon mohos koji blancos (*Aspergillus kawachii* IFO4308) cultivados con antelación en medio líquido, de modo que su cantidad se ajustó al 1% (vol/vol) para el medio líquido. En cuanto a la cebada cruda, se usó un 95% de cebada Stirling pulida de Australia (esto es básicamente cierto en los ejemplos del presente documento que se exponen a continuación).

Después, se efectuó el cultivo durante 48 horas a na temperatura de 37°C y a una velocidad de agitación de 100 rpm. Tras finalizar el cultivo, en cada uno de los productos de cultivo resultantes se midió la actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido. Las actividades de la glucoamilasa y de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de los productos de cultivo obtenidos del cultivo de mohos koji en el medio líquido dependiendo de las cantidades usadas de nitrato potásico se mostraron en la Tabla 1 y la FIG. 1.

Para medir la actividad enzimática de la glucoamilasa se usó un kit de cuantificación fraccional de la potencia de sacarificación (fabricado por Kikkoman). Para medir la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido, el procedimiento descrito por "Nagamine K. et al. : Biosci. Biotechnol. Biochem, 67, 2194-2202 (2003)" se modificó ligeramente. Es decir, la  $\alpha$ -amilasa inestable en ácido se inactivó tratando el producto de cultivo con ácido y, después, se midió la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido con un kit de medición de  $\alpha$ -amilasa (fabricado por Kikkoman). Para ser más específico, se añadieron 9 ml de tampón de ácido acético 100 mM (pH 3) a 1 ml de la solución de cultivo, se realizó un tratamiento con ácido a 37°C durante 1 hora y después se midió con el kit de medición de  $\alpha$ -amilasa (fabricado por Kikkoman).

Como se muestra en la Tabla 1 y la FIG. 1, las actividades de las enzimas glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido mejoraron considerablemente tanto en el gráfico en el que se había añadido un 0,2% como en el gráfico en el que se había añadido un 0,4% cuando los medios líquidos se cultivaron con adición de nitrato potásico como sustancia de nitrógeno inorgánico, en comparación con las del gráfico control sin adición y, asimismo, el equilibrio entre la glucoamilasa y la glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido era bueno.

Tabla 1

	Cantidad a añadir de KNO <sub>3</sub> (peso/vol)	Actividad enzimática (U/ml)	
		Glucoamilasa (GA)	$\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA)
Nº 1 (control)	Sin adición	32,6	2,5

(continuación)

Nº 2	0,20%	124,3	8,7
Nº 3	0,40%	137,9	7,9

**Ejemplo 2****Adición de una pluralidad de sustancias inorgánicas en la producción de koji líquido**

5 El efecto cuando se añadió una pluralidad de sustancias inorgánicas se investigó como se describe a continuación.

10 Nitrato potásico o nitrato sódico como sustancia de nitrógeno inorgánico y dihidrógeno fosfato potásico como sal inorgánica se añadieron al agua en las composiciones mostradas en la Tabla 2. La cantidad a añadir de nitrato sódico se calculó a partir de la concentración molar correspondiente a 2,0% de nitrato potásico, es decir 20 mM, y se mezcló al 1,7% de forma que las concentraciones del ion nitrato fueran las mismas. Como control se usó agua sin sustancia de nitrógeno inorgánico ni sal inorgánica.

15 Al agua materia prima preparada como se ha descrito anteriormente se añadió cebada cruda como materia prima de cultivo en una concentración de 2% (peso/vol) y se prepararon 4 tipos de medios líquidos. El cultivo líquido de los mohos koji blancos se realizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. Después se determinó la actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. La tabla 2 y la FIG. 2 muestran los resultados.

**Tabla 2**

	Medio (2% de medio de cebada cruda)				Actividad enzimática (U/ml)	
	Sustancia de nitrógeno inorgánico (peso/vol)		Sal inorgánica (peso/vol)		Glucoamilasa (GA)	$\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA)
Nº 1 (control)	-		-		32,6	2,5
Nº 2	0,20%	KNO <sub>3</sub>	0,27%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	143,6	8,8
Nº 3	0,17%	NaNO <sub>3</sub>	0,27%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125,6	7,7

20 Como se muestra en la Tabla 2 y la FIG. 2, las actividades de las enzimas glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido se mejoraron en los gráficos con adición de la sustancia de nitrógeno inorgánico y la sal inorgánica en comparación con el gráfico control sin adición.

**Ejemplo 3****Adición de células de levadura o autolisado de levadura en la producción de koji líquido**

El koji líquido se produjo usando medio líquido al cual se añadieron células de levadura o autolisado de levadura (es decir, extracto de levadura).

25 (1) Preparación de células de levadura o autolisado de levadura para añadir

La levadura de cerveza recuperada de una etapa de fermentación de cerveza se trató en las siguientes condiciones para obtener de este modo células de levadura de cerveza y autolisados de levadura (1) y (2) para usar en la producción de koji líquido.

30 Células de levadura: Las células de levadura de cerveza obtenidas mediante deshidratación de la levadura de cerveza hasta un contenido de agua del 70% por medio de centrifugación a 5.000 × g durante 15 minutos.

Autolisado de levadura (1): El autolisado de levadura obtenido suspendiendo células de levadura de cerveza en una cantidad igual de agua y tratando la mezcla a 52 °C durante 18 horas.

Autolisado de levadura (2): El autolisado de levadura obtenido suspendiendo células de levadura de cerveza en una

cantidad de 1% de ácido láctico y tratando la mezcla a 52 °C durante 18 horas.

(2) Preparación de koji líquido usando medio líquido al que se añade levadura

- 5 Cada una de las células de levadura y autolisados de levadura (1) y (2) que se prepararon como se ha descrito anteriormente se añadió a agua para tener concentraciones de 0,20%, 0,50% y 1% (v/vol), respectivamente, para preparar de este modo el agua materia prima. A cada una del agua materia prima se añadió cebada cruda como materia prima de cultivo para tener una concentración del 2 % (peso/vol), de modo que se prepara medio líquido. El cultivo líquido de los mohos koji blancos se realizó en las mismas condiciones que las del Ejemplo 1. Después se determinaron la actividad de la glucoamilasa y la actividad de  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1.
- 10 Como control se preparó medio líquido (es decir, gráfico nº 1) añadiendo solo cebada cruda en una concentración de únicamente 2% (peso/volumen) y, después, se inocularon al mismos mohos koji blancos del mismo modo que en el ejemplo 1 para realizar un cultivo líquido. La actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido del koji líquido resultante se determinaron del mismo modo. La Tabla 3 y la FIG. 3 muestran los resultados.

**Tabla 3**

	Medio (2% de medio de cebada cruda)			Actividad enzimática (U/ml)	
	Células de levadura*	Autolisado de levadura (1)*	Autolisado de levadura (2)*	Glucoamilasa (GA)	$\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA)
Nº 1	-	-	-	16,3	1,0
Nº 2	0,2%	-	-	29,2	2,1
Nº 3	0,5%	-	-	48,2	2,1
Nº 4	1,0%	-	-	74,9	9,2
Nº 5	-	0,2%	-	35,3	2,5
Nº 6	-	0,5%	-	56,6	3,1
Nº 7	-	1,0%	-	110,0	9,6
Nº 8	-	-	0,2%	23,7	1,8
Nº 9	-	-	0,5%	59,1	5,2
Nº 10	-	-	1,0%	68,0	10,3

\*: la unidad es v/vol

15

(3) Resultados

- 20 Como se muestra en la Tabla 3 y la FIG. 3, tanto la actividad de la glucoamilasa como la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido mejoraron en todos los gráficos experimentales a los que se añadieron las propias células de levadura y en los gráficos experimentales a los que se añadió autolisado de levadura, en comparación con los del gráfico control (es decir, gráfico Nº 1) sin adición. En particular, el gráfico experimental Nº 7 mostró un buen resultado. Además, en cada gráfico experimental, la actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido se mejoraron en proporción a la cantidad a añadir de las células de levadura o del autolisado de levadura.

**Ejemplo 4**

**25 Adición en combinación de sustancia de nitrógeno inorgánico y/o sal inorgánica con células de levadura**

El nitrato potásico, el dihidrógenofosfato potásico y las células de levadura se combinaron del modo mostrado en la

Tabla 4 y se añadieron a agua para preparar agua materia prima. Las células de levadura usadas fueron las propias células de levadura de cerveza (es decir, las células de levadura preparadas en el ejemplo 3) obtenidas mediante deshidratación de la levadura de cerveza recuperada de una etapa de fermentación de cerveza a un contenido de agua de aproximadamente un 70% por medio de centrifugación. Como control (es decir, gráfico nº 1) se usó agua materia prima sin adición.

Al agua materia prima preparada con las combinaciones mostradas en la Tabla 4 en una concentración del 2% (peso/vol) se añadió cebada cruda. Se inocularon mohos koji blancos al medio líquido del mismo modo que en el ejemplo 1 para realizar un cultivo líquido. Se determinaron, respectivamente, la actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido en los medios líquidos se determinaron. La Tabla 4 y la FIG. 4 muestran los resultados.

**Tabla 4**

	Medio (2% de medio de cebada cruda)			Actividad enzimática (U/ml)	
	KNO <sub>3</sub> (peso/vol)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (peso/vol)	Células de levadura (v/vol)	Glucoamilasa (GA)	$\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA)
Nº 1 (control)	-	-	-	32,6	0,8
Nº 2	0,05%	-	-	52,9	3,8
Nº 3	0,10%	-	-	91,7	4,6
Nº 4	0,20%	-	-	114,0	5,6
Nº 5	0,40%	-	-	137,9	6,9
Nº 6	-	-	0,20%	40,8	2,4
Nº 7	0,05%	-	0,20%	60,3	3,7
Nº 8	0,10%	-	0,20%	101,4	5,4
Nº 9	0,20%	-	0,20%	103,6	6,4
Nº 10	0,40%	-	0,20%	139,9	8,6
Nº 11	-	-	0,50%	44,5	3,7
Nº 12	0,05%	-	0,50%	94,4	6,5
Nº 13	0,10%	-	0,50%	94,9	6,9
Nº 14	0,20%	-	0,50%	135,7	8,3
Nº 15	0,40%	-	0,50%	154,0	10,4
Nº 16	0,20%	0,30%	-	139,9	10,5
Nº 17	0,20%	0,30%	0,20%	160,7	11,6
Nº 18	0,20%	0,30%	0,50%	178,5	12,3

Como se muestra en la Tabla 4 y la FIG. 4, tanto la actividad de la glucoamilasa como la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido eran extremadamente altas en todos los gráficos experimentales en comparación con las del gráfico control (es decir, gráfico nº 1) sin adición. En particular, en los gráficos experimentales nº 15 a nº 18, las actividades de ambas enzimas eran extremadamente altas. De los resultados se pensó que el uso combinado de la sustancia de nitrógeno inorgánico y/o la sal inorgánica con las células de levadura mejoraron el equilibrio de nutrición en el medio líquido, de modo que los hongos filamentosos produjeron rápidamente las enzimas.

**Ejemplo 5**

**Combinación de salvado de cebada, células de levadura y sustancia inorgánica**

El salvado de cebada y las células de levadura, el nitrato potásico y el dihidrógenofosfato potásico se combinaron del modo mostrado en la Tabla 5 y se añadieron a agua para preparar agua materia prima para el medio líquido. El salvado de cebada usado fue el recuperado de una etapa de perlado para el 70% de la cebada pulida (Stirling, hecha en Australia) y contenía cáscaras y salvado de cebada. Las células de levadura usadas fueron las propias células de levadura de cerveza (es decir, las células de levadura preparadas en el ejemplo 3) obtenidas mediante deshidratación de la levadura de cerveza recuperada de una etapa de fermentación de cerveza a un contenido de agua de aproximadamente un 70% por medio de centrifugación. Como control se usó agua materia prima sin adición.

Al agua materia prima preparada con las combinaciones mostradas en la Tabla 5 en una concentración del 2% (peso/vol) se añadió cebada cruda. Se inocularon mohos koji blancos al medio líquido del mismo modo que en el ejemplo 1 para realizar un cultivo líquido. La actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido en los medios líquidos se determinaron respectivamente del mismo modo. La Tabla 5 y la FIG. 5 muestran los resultados.

Tabla 5

	Medio (2% de medio de cebada cruda)			Actividad enzimática (U/ml)	
	Compuesto inorgánico	Salvado de cebada (peso/vol)	Células de levadura (v/vol)	Glucoamilasa (GA)	$\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA)
Nº 1 (control)	-	-	-	25,7	0,9
Nº 2	-	0,1%	0,1%	43,5	2,9
Nº 3	-	0,5%	0,5%	54,6	3,9
Nº 4	-	1,0%	1,0%	111,0	13,6
Nº 5	-	2,0%	2,0%	50,9	8,5
Nº 6	-	1,0%	-	77,6	8,9
Nº 7	-	-	1,0	92,3	9,5
Nº 8	o	1,0%	-	106,0	10,3
Nº 9	o	-	1,0%	318,6	15,5

o: un gráfico experimental al que se añadió 0,2% (peso/vol) de nitrato potásico y 0,3% (peso/vol) de dihidrógenofosfato potásico.

Como se muestra en la Tabla 5 y la FIG. 5, tanto la actividad de la glucoamilasa como la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido eran extremadamente altas en todos los gráficos experimentales en comparación con las del gráfico control (es decir, gráfico nº 1) sin adición. En particular, en el gráfico experimental nº 4, las actividades de ambas enzimas eran extremadamente altas y el equilibrio fue bueno. De los resultados se pensó que el uso combinado de salvado de cebada con las células de levadura mejoró el equilibrio de nutrición en el medio líquido, de modo que los hongos filamentosos produjeron rápidamente las enzimas.

Cabe destacar que el uso combinado del salvado de cebada o las células de levadura con la sustancia de nitrógeno inorgánico y la sal inorgánica (es decir, los gráficos nº 8 y nº 9) mostraron un buen resultado.

### Ejemplo 6

#### Adición en combinación de cáscaras de cebada y células de levadura

El nitrato potásico, el dihidrógenofosfato potásico, cáscaras de cebada y las células de levadura se combinaron del modo mostrado en la Tabla 6 y se añadieron a agua bruta para preparar agua materia prima para el medio líquido. Las cáscaras de cebada usadas fueron las obtenidas colando el salvado de cebada obtenido de una etapa de perlado para el 70% de la cebada pulida con un tamiz de malla 2 mm y, después, recuperando únicamente las cáscaras de cebada. Además, la levadura comprimida usada fue las propias células de levadura (es decir, las células de levadura preparadas en el ejemplo 3) obtenidas mediante deshidratación de la levadura de cerveza recuperada de una etapa de fermentación de cerveza a un contenido de agua de aproximadamente un 70% por medio de centrifugación. Como control (es decir, gráfico nº 1) se usó agua bruta sin adición.

Al agua materia prima preparada con las combinaciones mostradas en la Tabla 6 en una concentración del 2% (peso/vol) se añadió cebada cruda. Se inocularon mohos koji blancos al medio líquido del mismo modo que en el ejemplo 1 para realizar un cultivo líquido. Se determinaron, respectivamente, la actividad de la glucoamilasa y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido en los medios líquidos se determinaron. La Tabla 6 y la FIG. 6 muestran los resultados.

5

Tabla 6

	Medio		Actividad enzimática (U/ml)	
	Células de levadura (v/vol)	Cáscaras de cebada (peso/vol)	Glucoamilasa (GA)	$\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA)
Nº 1 (control)	-	-	33,9	0,8
Nº 2	-	0,1%	65,3	5,5
Nº 3	-	0,5%	55,2	6,3
Nº 4	-	1,0%	48,5	6,9
Nº 5	-	2,0%	44,3	4,6
Nº 6	1,0%	0,1%	94,4	9,9
Nº 7	1,0%	0,5%	79,8	9,4
Nº 8	1,0%	1,0%	85,8	11,0
Nº 9	1,0%	2,0%	82,3	7,1

Como se muestra en la Tabla 6 y la FIG. 6, tanto la actividad de la glucoamilasa como la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido eran extremadamente altas en todos los gráficos experimentales en comparación con las del gráfico control (es decir, gráfico nº 1) sin adición. En particular, en los gráficos experimentales nº 6 a nº 9, las actividades de ambas enzimas eran extremadamente altas y el equilibrio fue bueno. De los resultados se pensó que el uso combinado de las cáscaras de cebada con las células de levadura mejoró el equilibrio de nutrición en el medio líquido, de modo que los hongos filamentosos produjeron rápidamente las enzimas.

10

### Ejemplo 7

#### 15 Efecto de la adición de sal sulfato en la producción de koji líquido

El koji líquido se produjo mediante el procedimiento descrito más adelante y se determinaron las actividades enzimáticas del mismo.

##### 1. Procedimiento de precultivo

8 g de 65% de cebada pulida (Stirling, hecha en Australia) y 100 ml de agua se cargaron en un matraz Erlenmeyer reflectado de 500 ml y se introdujo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de enfriar se inocularon los mohos koji blancos (*Aspergillus kawachii* NBRC4308) a  $1 \times 10^6$ /ml en el medio de precultivo y se cultivaron agitando a 37°C y a 100 rpm durante 24 horas. El medio se definió como medio de precultivo.

20

##### 2. Procedimiento del cultivo principal

Se prepararon 100 ml de medio líquido, respectivamente, como cinco gráficos experimentales, conteniendo cada uno 2,0% (peso/vol) de 98% de cebada pulida (cebada cruda, Stirling, hecha en Australia), 0,2% (peso/vol) de nitrato potásico, 0,3% (peso/vol) de dihidrógenofosfato potásico, 0,1% (peso/vol) de sulfato de magnesio heptahidrato y 0,082% (peso/vol) de cloruro de magnesio hexahidrato a la proporción de la composición como se muestra en la Tabla 7. Estos cinco medios líquidos se cargaron, respectivamente, en un matraz Erlenmeyer reflectado de 500 ml y se introdujo a 121 °C durante 15 minutos para esterilizar.

25

Después de enfriar, se inoculó 1 ml del líquido de precultivo en el medio de cultivo principal y la totalidad se cultivó agitando a 37°C y a 100 rpm durante 48 horas. Obsérvese que la cantidad a añadir de cloruro de magnesio hexahidrato se calculó a partir de la concentración molar correspondiente a 0,1% de sulfato de magnesio heptahidrato, es decir, 8,12 mM, de modo que las concentraciones de magnesio de los medios en cada gráfico

30

experimental se igualaron.

**Tabla 7**

	Composición del medio				
Gráfico experimental 1	2% de cebada cruda	0,2% de KNO <sub>3</sub>	0,3% de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-
Gráfico experimental 2	2% de cebada cruda	0,2% de KNO <sub>3</sub>	0,3% de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1% de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-
Gráfico experimental 3	2% de cebada cruda	0,2% de KNO <sub>3</sub>	0,3% de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,082 % de MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
Gráfico experimental 4	2% de cebada cruda	-	0,3% de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1% de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-
Gráfico experimental 5	2% de cebada cruda	0,2% de KNO <sub>3</sub>	-	0,1% de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-

### 3. Procedimiento de determinar la actividad enzimática

- 5 Tras la finalización del cultivo, se determinaron las actividades de la glucoamilasa (GA) y de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA) que eran enzimas amilolíticas.

La actividad de la glucoamilasa (GA) se determinó usando un kit de cuantificación fraccional de la potencia de sacarificación (fabricado por Kikkoman).

- 10 Para determinar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido (ASAA), el procedimiento descrito en Sudo S. et al: J. Ferment. Bioeng., 76, 105-110 (1993), Sudo S. et al: J. Ferment. Bioeng., 77, 483-489 (1994), y Shigetoshi Sudo et al: Journal of the Brewing Society of Japan, 89, 768-774(1994) se modificó ligeramente. Es decir, la actividad de la  $\alpha$ -amilasa inestable en ácido se inactivó tratando el producto de cultivo con ácido y, después, se midió la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido con un kit de medición de  $\alpha$ -amilasa (fabricado por Kikkoman). Para ser más específico, se añadieron 9 ml de una solución de tampón de ácido acético 100 mM (pH 3) a 1 ml de la solución de cultivo y se realizó un tratamiento con ácido a 37°C durante 1 hora y después se midió con el kit de medición de  $\alpha$ -amilasa (fabricado por Kikkoman).

Al mismo tiempo se determinaron la actividad de la celulasa (CEL) que es una enzima celulolítica y la actividad de la carboxipeptidasa ácida (ACP) que es una de las enzimas proteolíticas.

- 20 La actividad de la celulasa (CEL) se midió mediante el procedimiento de cuantificación de una cantidad del sacárido reducido que se generó hidrolizando la carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato con el procedimiento del ácido dinitrosalicílico (DNS). Para ser más específicos, se añadió 1 ml de la solución de cultivo a 1 ml de 1% de la solución de sustrato de CMC (low viscosity™ producida por Sigma-Aldrich se disolvió en una solución de tampón de ácido acético 100 mM (pH 5)), y la totalidad se sometió a reacción enzimática a 40°C exactamente durante 10 minutos. Después, a la mezcla se añadieron 4 ml del reactivo DNS que contiene 0,75% de ácido dinitrosalicílico, 1,2% de hidróxido sódico, 22,5% de tartrato sódico potásico tetrahidrato y 0,3% de lactosa monohidrato y todo se mezcló bien para terminar de este modo la reacción. Con el fin de cuantificar la cantidad de sacárido reducido en la solución de reacción terminada, la solución de reacción terminada se calentó en un baño de agua en ebullición exactamente durante 15 minutos. Después, una vez que la solución se enfrió hasta la temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 540 nm para cuantificar de este modo la cantidad del sacárido reducido correspondiente a la glucosa.
- 30 Una unidad de actividad de la celulasa (CEL) se representó mediante la cantidad de enzima requerida para producir el sacárido reducido correspondiente a 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto.

La actividad de la carboxipeptidasa ácida (ACP) se determinó usando un kit de medición de la carboxipeptidasa ácida (fabricado por Kikkoman).

La FIG. 7 muestra los resultados de la determinación.

### 35 4. Resultados

- Como se muestra en la FIG. 7A, la actividad de la glucoamilasa mejoró significativamente en el gráfico experimental 2 que es el gráfico al que se añadió sulfato de magnesio. Además, como se muestra en las FIGS. 7C y 7D, las actividades de la celulasa y la carboxipeptidasa ácida también mejoraron en el gráfico experimental 2 que es el gráfico al que se añadió sulfato de magnesio. Por otro lado, la actividad no se mejoró en el gráfico experimental 3 al que se añadió cloruro de magnesio, que es un tipo de la misma sal de magnesio, de modo que se sugirió que un

radical sulfato sirve como principal razón para estos ventajosos efectos en la productividad enzimática.

Además, los efectos ventajosos en la productividad enzimática no se observaron en los gráficos experimentales 4 y 5 a los que se añadió sulfato de magnesio pero no nitrato potásico ni dihidrógenofosfato potásico. En consecuencia, se halló que la productividad enzimática mejoró considerablemente cuando se incorporaron sales nitrato, sales fosfato y sales sulfatos al mismo tiempo.

Como se ha descrito anteriormente, cuando se cultivan mohos koji usando medio líquido al que se añaden los cereales cuya superficie está cubierta con cáscaras (p. ej., cebada bruta), sales nitrato, sales fosfato y sales sulfato, se puede producir koji líquido que contiene celulasa en alto rendimiento, que es una enzima celulolítica, y carboxipeptidasa ácida, que es una enzima proteolítica, además de las enzimas requeridas para producir shochu y similares, tales como glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido.

Debido al alto rendimiento de las enzimas celulolíticas, se puede esperar la disminución de la pasta de malta o el incremento en el rendimiento de alcohol durante la producción de shochu y si los componentes aminoácidos en la pasta de malta de shochu aumentan debido al alto rendimiento de las enzimas proteolíticas se puede producir shochu con un sabor maravilloso.

Además, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, cabe esperar que las enzimas producidas por los mohos koji, tal como las enzimas amilolíticas, enzimas celulolíticas y enzimas proteolíticas aparte de las determinadas en el presente documento, generalmente se produzcan con un rendimiento elevado.

#### **Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con la presente invención, es posible que no solo la productividad de las enzimas amilolíticas en koji líquido mejore significativamente sino que se produzca koji líquido que contiene enzimas celulolíticas y enzimas proteolíticas con un alto rendimiento. Adicionalmente, el cultivo líquido se puede controlar estrictamente en comparación con el cultivo sólido, de modo que se puede producir koji líquido con calidad de estabilidad con bajos costes.

Usando el koji líquido producido de acuerdo con la presente invención para producir bebidas y alimentos fermentados, tales como shochu, se pueden aumentar los rendimientos de alcohol y las cantidades de producción de aminoácidos, de modo que se pueden producir eficientemente las bebidas y alimentos fermentados tienen cada uno un sabor maravilloso.

Además, los cereales usados en la presente invención están sin pulir o pulidos en la medida en que al menos las cáscaras permanecen sobre la superficie. Por tanto se puede esperar una mejora de la disponibilidad de la materia prima y en el rendimiento.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas, comprendiendo cultivar mohos koji blanco y/o mohos koji negro en un medio líquido que contiene (i) un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscaras y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en nitrato potásico, nitrato sódico, células de levadura, productos tratados de células de levadura, cáscaras de cereales y salvado de cereal.
2. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las enzimas comprenden glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido.
- 10 3. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio líquido contiene:
  - un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscaras;
  - al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en nitrato potásico y nitrato sódico;
  - al menos una sal fosfato seleccionada del grupo que consiste en dihidrógenofosfato potásico y fosfato amónico; y
  - 15 al menos una sal sulfato seleccionada del grupo que consiste en sulfato de magnesio heptahidrato, sulfato de hierro heptahidrato y sulfato amónico.
- 20 4. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de enzimas de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el medio líquido contiene la al menos una fuente de nitrógeno en una concentración de 0,1 a 2,0% (peso/volumen).
5. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el medio líquido contiene la al menos sal fosfato en una concentración de 0,05 a 1,0% (peso/volumen).
- 25 6. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el medio líquido contiene la al menos una sal sulfato en una concentración de 0,01 a 0,5% (peso/volumen).
- 30 7. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cereal comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en arroz crudo, arroz con todas las glumas, arroz con parte de las glumas y cebada que tiene una proporción de pulido no inferior al 93%.
8. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los mohos koji blancos comprenden *Aspergillus kawachii*.
- 35 9. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los mohos koji negros comprenden al menos uno seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.
10. El procedimiento de producción de koji líquido que tiene una actividad potenciada de las enzimas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cereal comprende cebada.
- 40 11. Un procedimiento de producción de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido, que comprende producir la al menos una enzima cultivando mohos koji blanco y/o mohos koji negro en un medio líquido que contiene (i) un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscaras y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionado del grupo que consiste en nitrato potásico, nitrato sódico, células de levadura, productos tratados de células de levaduras, cáscaras de cereales y salvado de cereales.
- 45 12. Un procedimiento de producción de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa estable en ácido, celulasa y carboxipeptidasa ácida que comprende producir la al menos una enzima cultivando mohos koji blancos y/o mohos koji negros en un medio líquido, que contiene:
  - un cereal cuya superficie está completamente cubierta con cáscara;
  - al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en nitrato potásico y nitrato sódico;
  - al menos una sal fosfato seleccionada del grupo que consiste en dihidrógenofosfato potásico y fosfato amónico; y
  - 50 al menos una sal sulfato seleccionada del grupo que consiste en sulfato de magnesio heptahidrato, sulfato de hierro heptahidrato y sulfato amónico.
13. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el medio líquido contiene la al menos una fuente de nitrógeno en una concentración de 0,1 a 2,0% (peso/volumen).
- 55 14. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el medio líquido contiene la al menos una sal fosfato en una concentración de 0,05 a 1,0% (peso/volumen).

15. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el medio líquido contiene la al menos una sal sulfato en una concentración de 0,01 a 0,5% (peso/volumen).
16. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el cereal comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en arroz crudo, arroz con todas las glumas, arroz con parte de las glumas y cebada que tiene una proporción de pulido no inferior al 93%.
17. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que los mohos koji blancos comprenden *Aspergillus kawachii*.
18. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que los mohos koji negros comprenden al menos uno seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.
19. El procedimiento de producción de enzimas de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el cereal comprende cebada.

Fig. 1

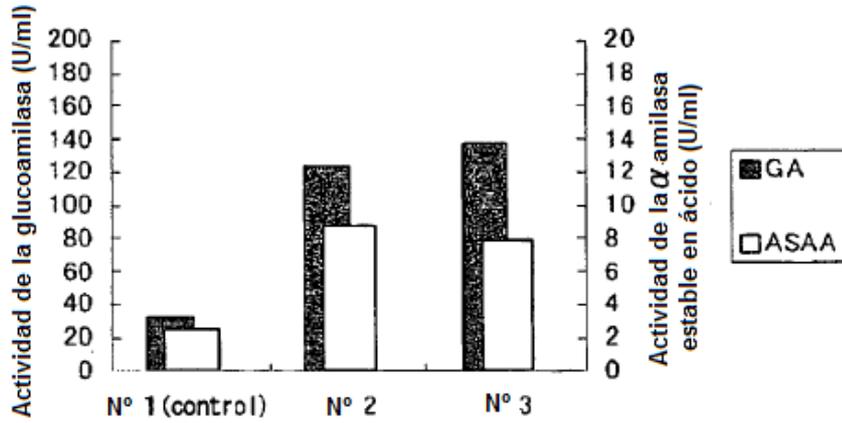


Fig. 2

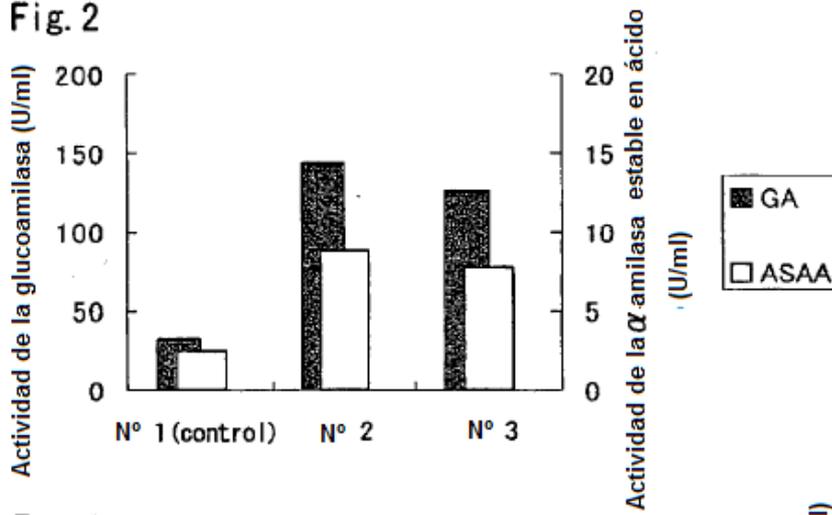


Fig. 3

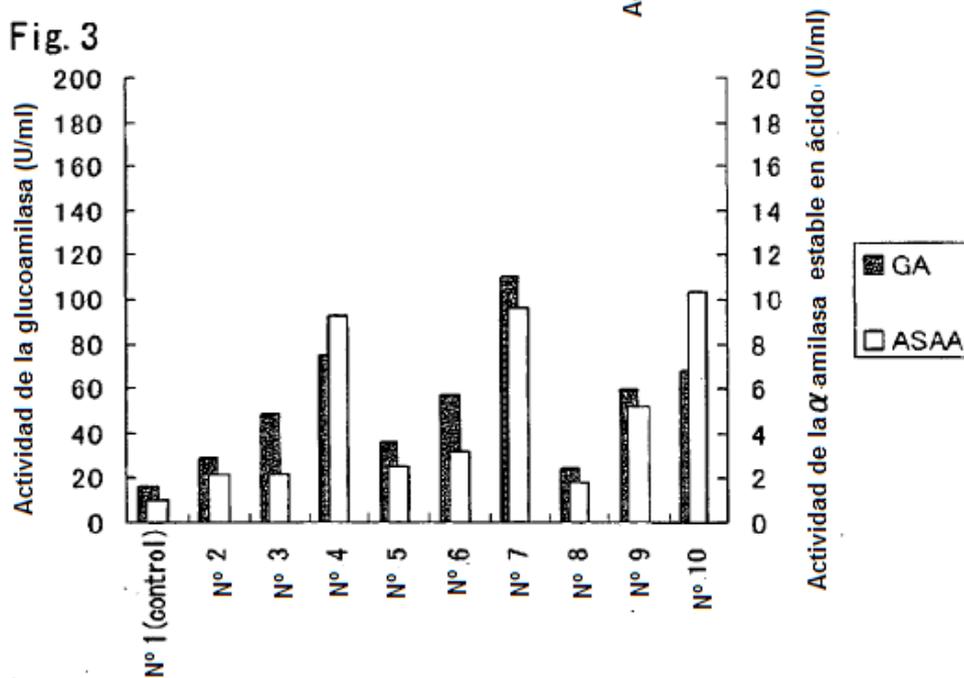


Fig. 4

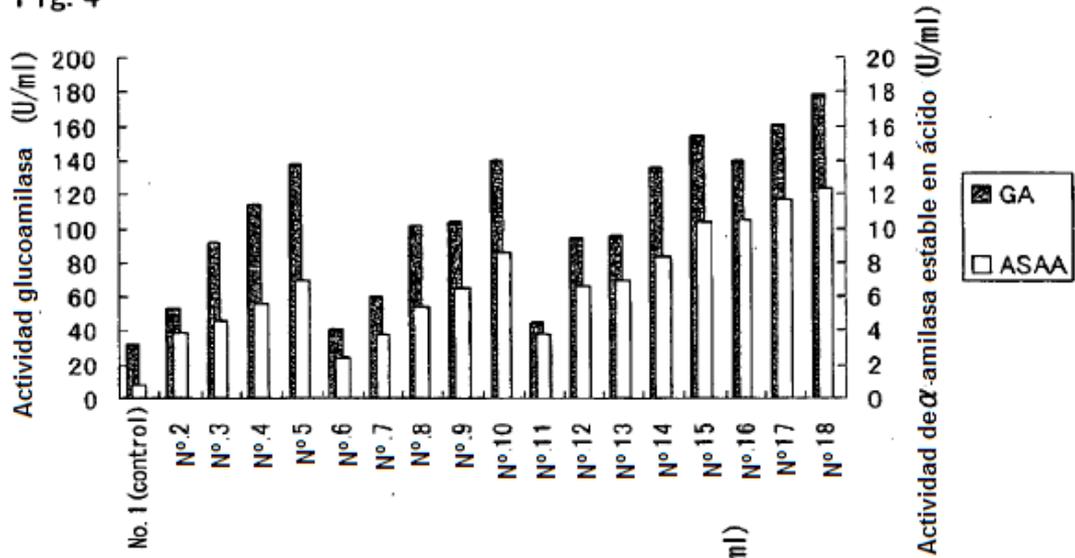


Fig. 5

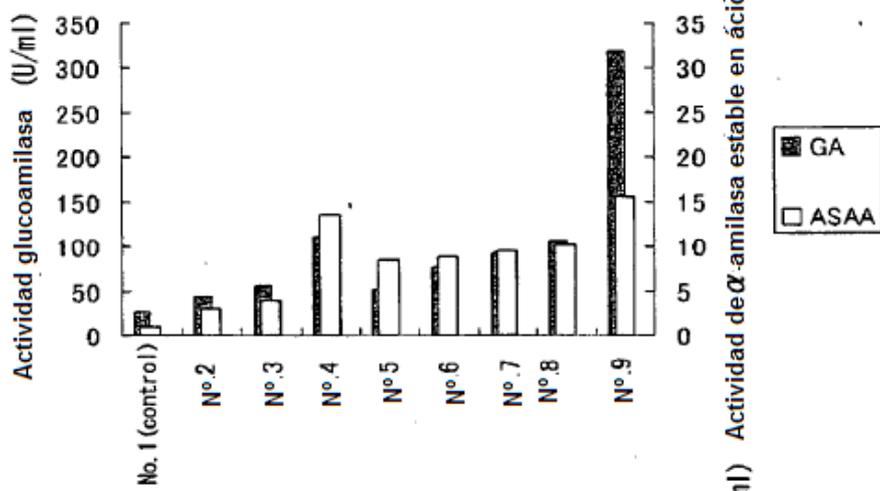


Fig. 6

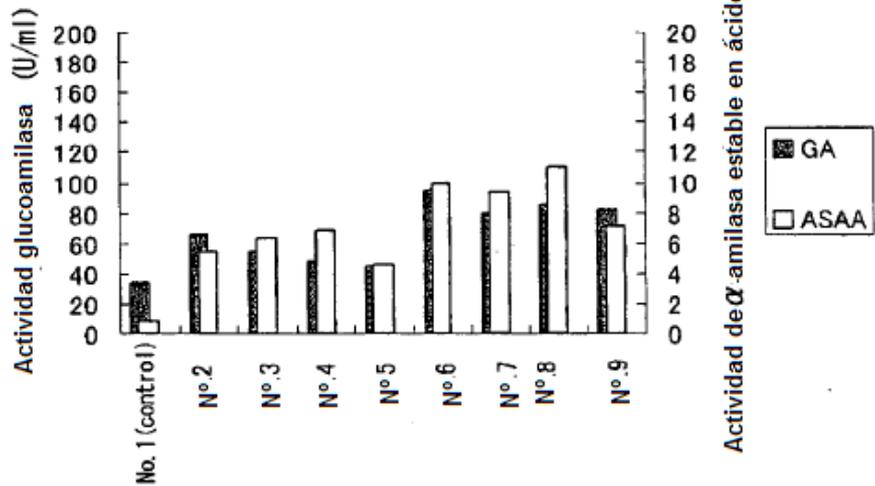


Fig. 7

