

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 413**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/26**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2015 PCT/FR2015/051581**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2015 E 15733838 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3155095**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de una solución acuosa estable de beta-amilasa, solución acuosa obtenida y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

**16.06.2014 FR 1455466**

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

**12.06.2019**

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)  
1 rue de la Haute Loge  
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**COURBOIS, VINCENT;  
LECOCQ, ALINE y  
DUFLOT, PIERRICK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 716 413 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 fabricación de una solución acuosa estable de beta-amilasa, solución acuosa obtenida y sus utilidades

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de una solución acuosa de  $\beta$ -amilasa, especialmente por utilización de glicerol, de sorbato de potasio y de carbonato de sodio. Este cóctel de aditivos resulta ser particularmente eficaz para mantener la actividad enzimática de la  $\beta$ -amilasa a lo largo del tiempo.

10 Otro objeto de la presente invención consiste en la utilización de dicho cóctel con la función particular de mantenimiento de la actividad enzimática de la  $\beta$ -amilasa. Otro objeto de la presente invención consiste en una solución acuosa de  $\beta$ -amilasa que contiene el cóctel antes citado. Un último objeto de la presente invención consiste en la utilización de dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa en panificación, en maltería, como aditivo alimentario, como agente digestivo, para la producción de edulcorantes, en farmacia y finalmente para la producción de la maltosa y de siropes enriquecidos con maltosa.

15 Las  $\beta$ -amilasas son unas exo-hidrolasas que liberan unas unidades maltosa a partir de los  $\beta$ -extremos no reductores de los polímeros u oligómeros de glucosa enlazados en  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4, deteniéndose la reacción en el primer punto de ramificación  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6 encontrado. Componentes principales del "poder diastásico" (que corresponde a las actividades combinadas de las  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas y enzimas desramificantes) durante el malteado (germinación artificial de los granos de cereales), las actividades  $\beta$ -amilásicas aisladas de este cóctel enzimático son esenciales para la producción de la maltosa o de otros azúcares fermentables generados a partir de almidón.

20 La actividad sacarificante de las únicas  $\beta$ -amilasas está por lo tanto explotada en un buen número de aplicaciones: en panificación, en maltería, como aditivo alimentario, incluso como agente digestivo, para la producción de edulcorantes, en farmacia para la producción de vacunas, y finalmente para la producción de maltosa y de siropes enriquecidos con maltosa (precursor del maltitol y de los siropes de maltitol).

25 Los procedimientos de fabricación de  $\beta$ -amilasas son numerosos. Se sabe así que los granos de cebada, de centeno o de trigo no germinados son buenos materiales biológicos de elección para la preparación comercial, a gran escala, de  $\beta$ -amilasas. Por otro lado, se conoce por el experto en la materia que la mitad de las  $\beta$ -amilasas extraíbles de los granos no germinados de la cebada, del trigo o del centeno puede ser fácilmente obtenida en forma de enzimas libres por extracción con agua y soluciones salinas. La otra mitad se presenta en parte en forma "enlazada" que necesita la adición de agentes reductores o de enzimas proteolíticas para su extracción. Otra fracción de  $\beta$ -amilasas no directamente extraíble, denominada "latente" también se ha descrito: se necesitan unos detergentes para extraerlo de los granos de cereales. Por otro lado, los procedimientos de extracción de la  $\beta$ -amilasa descritos en el estado de la técnica se adaptan en función de la aplicación considerada.

30 A este respecto, la solicitante ha desarrollado y protegido en la solicitud EP 2 414 379 un procedimiento original de producción de  $\beta$ -amilasas, en el sentido que se basa en una materia prima de partida hasta ahora poco valorizada: las "fracciones solubles". Estas últimas se utilizaban antes de manera exclusiva como fuente de nitrógeno en fermentación y como alimento nutritivo para el ganado una vez dichas fracciones se enriquecen con fibras.

35 Tales fracciones solubles se producen durante la extracción por vía húmeda de los componentes de las plantas productoras de almidón, como el maíz, la patata, la batata, el trigo, el arroz, el guisante, la haba, la habichuela, la mandioca, el sorgo, el konjac, el centeno, el alforfón y la cebada. Los componentes denominados "nobles" producidos durante la extracción, son en particular los almidones, las proteínas o también las fibras. Las "fracciones solubles" designan por oposición unos constituyentes "no nobles": se trata de los residuos líquidos procedentes de dicha extracción, aunque tales residuos pueden todavía contener en forma de trazas raras sustancias insolubles así como partículas y coloides diversos y variados.

40 El procedimiento objeto de la solicitud EP 2 414 379 se basa en la selección inicial de la fracción soluble a tratar, después en una etapa de clarificación realizada por microfiltración, y finalmente en una etapa de purificación por ultrafiltración. En esta ocasión, se ha demostrado que la  $\beta$ -amilasa obtenida era particularmente muy adecuada para la preparación de jarabes de maltosa, al igual que una  $\beta$ -amilasa producida según unas técnicas anteriores, pero a partir de procedimientos más complejos y más costosos.

45 A continuación, la solicitante ha protegido también unas mejoras de este procedimiento a través de la solicitud de patente FR 2 994 440 y la solicitud de patente francesa nº 13 56022 todavía no publicada en la fecha de depósito de la presente solicitud. Estas mejoras se basan en particular en la utilización de proteasas durante la etapa de microfiltración, lo que permite reducir muy fuertemente la obturación de las membranas de microfiltración y por lo tanto aumentar el tiempo de producción antes del lavado, así como sobre el uso de pectinasas durante la etapa de ultrafiltración, lo que permite limitar la obturación de las membranas de ultrafiltración, disminuir la viscosidad del retenido al final de esta etapa y aumentar al mismo tiempo su riqueza en  $\beta$ -amilasa.

55 Ahora bien, el retenido de ultrafiltración que contiene la  $\beta$ -amilasa en forma concentrada es susceptible de conservarse varias semanas, incluso varios meses, antes de utilizarse en las aplicaciones que ya se han citado

antes. Resulta entonces que su actividad enzimática disminuirá a lo largo del tiempo. Se recuerda que la actividad de una enzima es, por definición, la cantidad de sustrato transformado (o de producto formado) por unidad de tiempo y en las condiciones de funcionamiento óptimos de la enzima (temperatura, de pH, etc.). Esta dimensión cuantifica por lo tanto la eficacia de la enzima.

5 Clásicamente, la medición de la actividad enzimática se realiza a través de la determinación de otro parámetro: la actividad diastásica. Esta última se expresa en grado de poder diastásico (°DP), definido como la cantidad de enzima contenida en 0,1 ml de una solución al 5% en peso de una muestra de preparación de enzimas suficiente para reducir 5 ml de licor de Fehling, cuando dicha muestra se coloque en 100 ml de sustrato durante 1h a 20°C.

10 Se conoce en la actualidad un cierto número de documentos que describen unos procedimientos de obtención de  $\beta$ -amilasa, para mejorar su estabilidad desde el punto de vista de su actividad enzimática.

El documento CN102965358 divulga un procedimiento de obtención a partir de soja de una  $\beta$ -amilasa por precipitación, después drenaje, clarificación y ultrafiltración. Dicho procedimiento recurre a cloruro de calcio, y opcionalmente a sales del ácido sulfúrico a nivel de la etapa de precipitación.

15 El documento CN102399763 describe la producción de  $\beta$ -amilasa a partir de salvados, con adición de cloruro de calcio y de hidrógeno fosfato de sodio, después concentración y estabilización en presencia de sorbitol y de sorbato de potasio, antes de la esterilización.

El documento CN101544967 divulga un procedimiento de fabricación de  $\beta$ -amilasas por precipitación, separación y centrifugación, y preconiza después la adición de cloruro de calcio, de ácido ortofosfórico, de tierras de diatomea y de glicerol.

20 El documento CN1225943 describe un procedimiento de preparación de  $\beta$ -amilasa que comprende las etapas de ultrafiltración, concentración y precipitación de extractos de polvo de soja, precediéndose la precipitación por la adición de sulfato de sodio y la regulación del pH entre 3,6 y 5.

25 El documento US 2,496,261 describe un procedimiento de obtención de  $\beta$ -amilasa a partir de la batata, que comprende una etapa de precipitación en presencia de sulfato de amonio y después la acidificación con ácido clorhídrico.

El documento US 4,024,000 describe un procedimiento de preparación de  $\beta$ -amilasa que utiliza unos iones divalentes o trivalentes seleccionados entre los hidróxidos de calcio, magnesio, bario, aluminio y sus sales, y regulación del pH en un intervalo comprendido entre 4,5 y 8.

30 El documento D1 Tolan *et al.* "Cellulase from Submerged Fermentation", Advances in Biochemical Engineering, Vol. 65, 4 de mayo de 1999, páginas 41-67) menciona que unas composiciones sólidas de celulosa pueden estabilizarse mediante la adición de carbonato de sodio. Indica también que se pueden estabilizar unas composiciones líquidas por la adición de glicerol y de sorbato de potasio.

35 Ahora bien, es obligado constatar que ninguna de estas soluciones permite obtener una preparación de  $\beta$ -amilasa en forma de una solución acuosa que sea suficientemente estable en el tiempo, especialmente en periodos de varias semanas y más particularmente durante al menos 70 días, desde el punto de vista de su actividad enzimática. Prosiguiendo sus trabajos, la solicitante ha conseguido demostrar que sólo una selección muy particular de aditivos permitiría alcanzar tal objetivo. Este cóctel de aditivos está constituido de sorbato de potasio, de glicerol y de carbonato de sodio.

40 Además, un primer objeto de la invención consiste en un procedimiento de estabilización de una solución acuosa de  $\beta$ -amilasa obtenida a partir de una fracción soluble de planta almidonera, que comprende al menos una etapa de introducción en dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa de:

a) del 0,05 al 0,5% de sorbato de potasio;

b) del 30 al 50% de glicerol; y

c) del 0,05 al 0,5% de carbonato de sodio,

45 expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.

Ventajosamente, el sorbato de potasio, el glicerol y el carbonato de sodio se introducen en dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa en las proporciones siguientes:

a) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de sorbato de potasio;

50 b) del 35 al 45%, y preferiblemente alrededor del 40% de glicerol;

c) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de carbonato de sodio;

expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.

5 De manera ventajosa, la solución acuosa de  $\beta$ -amilasa presenta un contenido en peso seco de  $\beta$ -amilasa comprendido entre el 5 y el 20%, preferiblemente entre el 10% y el 20%, muy preferiblemente de aproximadamente el 15% con respecto al peso total de dicha solución acuosa.

10 El sorbato de potasio, el glicerol y el carbonato de sodio están preferiblemente en forma de soluciones acuosas. El experto en la materia sabrá adaptar el extracto seco de estas soluciones con respecto a la solubilidad de los productos pero también a fin de limitar la viscosidad de estas soluciones y de manera a hacerla fácilmente manipulable y especialmente bombeable.

Según un modo de realización, la solución acuosa de  $\beta$ -amilasa se obtiene mediante las etapas que consisten en:

- proporcionar una fracción soluble de plantas almidoneras;
- realizar sobre dicha fracción soluble una etapa de microfiltración a fin de obtener un permeado de microfiltración;
- 15 - realizar sobre el permeado de microfiltración una etapa de ultrafiltración a fin de obtener un retenido de ultrafiltración.

En este modo de realización, es por lo tanto dicho retenido de ultrafiltración que constituye dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa, en la que se introducen el sorbato de potasio, el glicerol y el carbonato de sodio.

20 De manera más detallada y al principio del procedimiento conforme a la invención, conviene seleccionar la fracción soluble de plantas almidoneras a tratar. Esta selección se realiza en particular en el grupo constituido de las fracciones solubles de maíz, de patata, de batata, de trigo, de arroz, de guisante, de haba, de habichuela, de mandioca, de sorgo, de konjac, de centeno, de alforfón y de cebada.

25 La microfiltración de la fracción soluble de planta productora de almidón tiene especialmente como objetivo eliminar las sustancias insolubles, los coloides, y el material microbiológico para obtener una composición límpida que contiene  $\beta$ -amilasa. Esta última composición pasa a ser por lo tanto el permeado de microfiltración. Según una variante particularmente ventajosa del presente modo de realización, dicha etapa de microfiltración se efectúa en presencia de al menos una proteasa. Previo a la microfiltración, la proteasa se pone en contacto con la fracción soluble de planta productora de almidón a tratar: el experto en la materia sabrá adaptar el tiempo de contacto necesario para la acción de la enzima.

30 La proteasa utilizada en la presente invención se selecciona preferentemente entre las serinas proteasas, las proteasas de tiol, las aspartil proteasas y las metalo proteasas, y se selecciona más particularmente entre las metalo proteasas. De manera nominativa, las proteasas preferidas en la presente invención son los productos comercializados bajo las denominaciones: Sumizyme™ APL, Lypaine™ 6500 L, Neutrased™ 0,8L, Brewlyve™ NP 900, Brewers Clarex™. Se preferirá utilizar una cantidad de proteasa comprendida entre el 0,01% y el 0,1% en volumen con respecto al volumen de la fracción soluble de planta productora de almidón a tratar.

35 La etapa de microfiltración del presente modo de realización se realiza preferiblemente por microfiltración tangencial membranaria. Más particularmente, la compañía solicitante recomienda realizar la microfiltración tangencial con unas membranas cerámicas que presentan una porosidad de 0,1  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ .

40 De manera facultativa, la etapa de microfiltración puede precederse de una etapa de floculación de las partículas insolubles contenidas en la fracción soluble de plantas almidoneras, mediante cualquier técnica conocida por otro lado por el experto en la materia.

Para esta primera etapa de microfiltración, la solicitante recomienda trabajar con un pH comprendido entre 4 y 5 y a una temperatura comprendida entre 40°C y 50°C.

La etapa de microfiltración está controlada en particular por la subida de la presión transmembranaria (PTM) en el tiempo, a caudal de permeado fijado.

45 En el presente modo de realización, la microfiltración está seguida de una etapa de ultrafiltración, que tiene como objetivo en primer lugar concentrar el permeado de microfiltración que contiene la  $\beta$ -amilasa, liberándose al mismo tiempo de eventuales sales residuales contaminantes, azúcares y proteínas. La ultrafiltración se realiza así sobre el permeado de la microfiltración a fin de obtener un retenido de ultrafiltración que contiene la  $\beta$ -amilasa.

50 Más particularmente, la compañía solicitante recomienda realizar la ultrafiltración con la ayuda de membranas que presentan un umbral de corte de 10 000 Da a 50 000 Da, preferentemente un umbral de corte de 30 000 Da. Las fracciones solubles pueden, por ejemplo, ultrafiltrarse sobre un módulo equipado de membranas polisulfonadas de

un umbral de corte de 30 000 Da en cassetes a escala de laboratorio y membranas en espirales polisulfonadas de un umbral de corte de 30 000 Da a escala piloto. La enzima se concentra entonces en el retenido a lo largo del tiempo.

Esta ultrafiltración se puede realizar en presencia de pectinada. En la presente solicitud, el término pectinasa designa unas enzimas capaces de descomponer las pectinas que son unos polímeros de polisacárido y que son uno de los constituyentes de las paredes celulares de las plantas. Están compuestas de una cadena principal de ácido urónico enlazado en 1-4. A este respecto, no deben asimilarse a las celulasas y a las hemicelulasas a las que se relacionan por error: las celulasas son unas enzimas que participan directamente en las reacciones de descomposición de la celulosa (cadenas lineales de moléculas de D-glucosa) mientras que las hemicelulasas consiguen hidrolizar la hemicelulosa (polímeros ramificados de azúcares en general, tales como glucosa, xilosa, etc.).

Típicamente, se introduce la pectinasa en el permeado de microfiltración antes de realizar la etapa de ultrafiltración y se deja actuar.

El experto en la materia sabrá adaptar el tiempo de contacto necesario para la acción de la enzima. Típicamente, se deja actuar la pectinasa de 30 minutos a 4 horas, preferiblemente de 30 minutos a 2 horas, y esto a una temperatura comprendida entre 25°C y 60°C, preferiblemente entre 25°C y 50°C.

Unas pectinasas particularmente adaptadas a la realización de la presente invención, son los productos Rapidase™ ADEX D (pectinasa; DSM), Peclyve™ ESP (pectinasa; Lyven), o Sumizyme™ ARS (pectinasa y arabanasa; Takabio), sin que estos ejemplos sean limitativos.

Se preferirá introducir una cantidad de pectinasa comprendida entre el 0,05% y el 1% en volumen con respecto al volumen total del permeado de microfiltración.

La etapa de ultrafiltración puede ir seguida de una etapa de diálisis del retenido de ultrafiltración a fin de disminuir la concentración en impurezas en dicho retenido.

Por otro lado, es deseable mantener dicha solución de  $\beta$ -amilasa tal como se obtiene a una temperatura inferior a 15°C, preferiblemente inferior a 10°C, idealmente en torno a los 5°C, a fin de mejorar todavía más el mantenimiento de su actividad enzimática.

Otro objeto de la presente invención es la utilización, para mantener la actividad enzimática de  $\beta$ -amilasa en solución acuosa, de:

a) sorbato de potasio;

b) glicerol; y

c) carbonato de sodio.

Por mantenimiento de la actividad enzimática, se entiende la capacidad de limitar la caída de grado DP<sup>o</sup> como se indica en la parte experimental. Típicamente, se hablará de mantenimiento si el grado DP<sup>o</sup> es todavía superior a al menos el 70% de su valor inicial, después de 70 días y a una temperatura de 37°C.

Otro objeto de la presente invención consiste en una solución acuosa de  $\beta$ -amilasa estabilizada, que contiene:

a) del 0,05 al 0,5% de sorbato de potasio;

b) del 30 al 50% de glicerol; y

c) del 0,05 al 0,5% de carbonato de sodio,

expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa.

Más particularmente, esta solución acuosa de  $\beta$ -amilasa estabilizada contiene:

a) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de sorbato de potasio;

b) del 35 al 45%, y preferiblemente alrededor del 40% de glicerol;

c) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de carbonato de sodio;

expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa.

Presenta también un contenido en peso seco de  $\beta$ -amilasa comprendido entre el 5 y el 20%, preferiblemente entre el 10% y el 20%, muy preferiblemente en torno al 15% con respecto al peso total de dicha solución acuosa.

Un último objeto de la presente invención consiste en la utilización de la solución acuosa de  $\beta$ -amilasa estabilizada conforme a la invención en panificación, en maltería, como aditivo alimentario, como agente digestivo, para la producción de edulcorantes, en farmacia para la producción de vacunas, y finalmente para la producción de maltosa y de siropes enriquecidos en maltosa (precursor del maltitol y de los siropes de maltitol).

- 5 Los ejemplos siguientes permiten comprender mejor la invención, sin limitar no obstante su alcance.

### Ejemplos

#### Fabricación de soluciones acuosas de beta-amilasa

10 Se empieza por extraer en almidonería de trigo una fracción soluble en la entrada del evaporador de los solubles, etapa clásicamente realizada para fabricar unos productos destinados a la alimentación del ganado, una vez concentrados. Estos productos se comercializan por la compañía solicitante bajo el nombre de Corami®. Estas fracciones solubles presentan un pH comprendido entre 4 y 5, y una actividad  $\beta$ -amilásica del orden de 30 °DP/ml.

15 Se realiza aquí, en un equipamiento a escala piloto, la microfiltración de fracciones solubles de trigo. La unidad de microfiltración está equipada de membranas crámicas de óxido de titanio, cuyo umbral de corte es igual a 0,2  $\mu$ m. El caudal de permeado se fija en 12l/(h m<sup>2</sup>). El factor de concentración en volumen es igual a 1,5. La temperatura y el pH del permeado son respectivamente iguales a 45°C y aproximadamente 4,5.

Se añade en la fracción soluble de la proteasa neutrasa 0,8l (Novozyme) a una concentración fijada al 0,1% en volumen con respecto al volumen total de dicha composición. Se deja previamente actuar esta proteasa durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después, se realiza una ultrafiltración tal como se ha descrito anteriormente.

20 Se obtiene un permeado de microfiltración con un grado DP de 25 °DP/ml después de 1 hora de microfiltración, reflejando este grado la actividad enzimática de la solución que contiene la  $\beta$ -amilasa. La medición de la actividad enzimática se determina por la actividad diastásica. Esta última se expresa en grado de poder diastásico (°DP), definido como la cantidad de enzima contenida en 0,1 ml de una solución al 5% en peso de una muestra de preparación de enzimas suficiente para reducir 5 ml de licor de Fehling, cuando dicha muestra está colocada en 100 ml de sustrato durante 1h a 20°C.

30 La etapa de microfiltración está seguida por una etapa de ultrafiltración, realizada sobre el permeado de microfiltración. Tiene como objetivo principal concentrar dicho permeado y liberarlo de eventuales sales residuales contaminantes, azúcares y proteínas. El piloto de ultrafiltración está equipado de membranas orgánicas de polisulfona, que tiene un umbral de corte 25 kDa (membrana Alfa Laval). La temperatura de filtración se fija a 25°C para limitar al máximo los desarrollos bacteriológicos y preservar la actividad enzimática. La presión transmembranaria (PTM) se fija a 4 bar máximos.

Se obtiene entonces una solución acuosa de  $\beta$ -amilasa que consiste en el retenido de ultrafiltración, que tiene un contenido en peso seco de  $\beta$ -amilasa igual al 15% de su peso total.

35 Se ensayaron diferentes cócteles, tales como se indican en las tablas 1 a 3. Todos los % se expresan en % en peso seco de producto, con respecto al peso total de la solución acuosa. Una vez las preparaciones realizadas, se efectúa una evaluación enzimática de cada muestra (contenido en bote de 100 ml estériles) según el método descrito en la solicitud de patente FR 2 994 440 (medición de la actividad beta-amilásica). Este valor es objeto de referencia para el conjunto del estudio. Las diferentes muestras se colocan después en una estufa a temperatura controlada: 37°C durante el periodo deseado; se efectúa entonces una extracción para medir la actividad beta-amilásica residual en diferentes momentos (los días de extracción se indican en las tablas 1 a 3). Los resultados aparecen en las tablas 1 a 3, y se expresan como unos % de actividad beta-amilásica residual. Se elige disponerse a 37°C a fom de acelerar los fenómenos que rigen la caída de la actividad enzimática.

45 La tabla 1 bis demuestra que el mejor resultado se obtiene con la mezcla de un 40% de glicerol, un 0,2% de sorbato de potasio y un 0,2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Demuestra también que, con respecto a otros cócteles que utilizan otros ingredientes, es claramente la solución según la invención que permite desarrollar el mejor nivel de estabilidad. Se trata claramente, por lo tanto, de una selección no evidente de ingredientes para realizar un cóctel, que conduce a unos resultados sorprendentes y muy ventajosos, en términos de limitación de la pérdida de actividad enzimática. La tabla 1 bis demuestra que unos cócteles como se describen en la reivindicación 1 de la presente solicitud permiten desarrollar unos niveles de estabilidad muy importantes. La mayor estabilidad se obtiene, por otro lado, con el último cóctel descrito en esta tabla, realizado con las dosis óptimas de cada ingrediente, como se describe en la reivindicación 2 de la presente solicitud.

50 La tabla 2 demuestra que el glicerol, utilizado solo, e incluso a dosis alta, no permite alcanzar el nivel de estabilidad satisfactorio. La tabla 3 demuestra que la sustitución del glicerol por otros azúcares no permite tampoco alcanzar un nivel de estabilidad satisfactorio.

ES 2 716 413 T3

Tabla 1

días	50% glicerol + 0,2% SP	50% glicerol + 0,2% SP + 1% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40% glicerol + 0,2% SP + 1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40% sorbitol + 0,2% SP + 1% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40% sorbitol + 0,2% SP + 1% CaCO <sub>3</sub>	50% glicerol + 0,2% SP + 1% CaCO <sub>3</sub>
0	100	100	100	100	100	100
20	98	98				
30			72			
34	89	89		77	85	92
60			60			
72	48	70	75	66	69	70
90		45	50	44	45	47

Tabla 1 bis

5

días	60% glicerol + 0,2% SP + 0,4% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40% glicerol + 1% SP + 0,4% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40% glicerol + 0,2% SP + 0,4% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40% glicerol + 0,4% SP + 0,2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40% glicerol + 0,2% SP + 0,2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
0	100	100	100	100	100
72	74	73	76	76	80
90	49	48	54	54	60

Tabla 2\*

	0% glicerol	30% glicerol	40% glicerol	50% glicerol
0	100	100	100	100
30	0	53	65	69
60	0	27	44	56
90	0	7	16	28

10

Tabla 3

días	50% glucosa	10% glicerol + 30% glucosa	20% glicerol + 20% glucosa	40% glucosa + 0,5% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40% glucosa + 3% NaCl	40% maltosa	40% mezcla (45% glucosa, 10% fructosa, 45% maltosa)
0	100	100	100	100	100	100	100
30	66	53	61	82	42	46	39
60	43	35	37	43	15	30	20

90	28	22	22	22	7		
SP: sorbato de potasio * cabe señalar por otro lado la formación de un depósito insoluble importante en el caso del carbonato de calcio							

Fabricación de siropes de maltosa

5 Se realizan después 2 ensayos, que se refieren a la fabricación de siropes de maltosa a partir de dos soluciones acuosas de beta-amilasa estabilizadas por un cóctel según la invención o por un cóctel fuera de la invención, habiendo sido estas 2 soluciones mantenidas 90 días a 25°C antes de utilizarse.

Una leche de almidón, con una materia seca del 31%, se licúa de manera clásica con la ayuda del 0,2% de una alfa-amilasa (TERMAMYL120L comercializada por la compañía NOVOZYME) a un pH de 5,7 a 6,5 hasta un DE ligeramente aproximadamente igual a 6.

10 Se calienta después el medio de reacción durante algunos segundos a 140°C a fin de inhibir la alfa-amilasa, después se ajusta el pH entre 5 y 5,5 y la temperatura a 55°C.

La sacarificación se lleva a cabo con una materia seca del 35%, o ligeramente inferior, en presencia de pululanasa (PULLUZYME 750L comercializada por la compañía ABM) y de alfa-amilasa maltogénica (MALTOGENASE 4000L comercializada por la compañía NOVOZYME) y de una solución acuosa de beta-amilasa, a unas dosis iguales al 0,1% sobre materia seca.

15 La solución acuosa de beta-amilasa consiste en el retenido de ultrafiltración, que tiene un contenido en peso seco de alfa-amilasa igual al 15% de su peso total, como se describe en el ejemplo anterior.

En un primer ensayo fuera de la invención, esta solución se ha estabilizado con el cóctel según la segunda columna de la tabla 1 (un 50% glicerol + un 0,2% SP + un 1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). La solución permanece a una temperatura de 25°C durante 90 días antes de utilizarse como se ha indicado anteriormente.

20 En un segundo ensayo según la invención, esta solución se ha estabilizado con el cóctel según la última columna de la tabla 1 bis (un 40% glicerol + un 0,2% SP + un 0,2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). La solución permanece a una temperatura de 25°C durante 90 días antes de ser utilizada como se ha indicado anteriormente.

Para estos 2 ensayos, la sacarificación, que dura aproximadamente 72 horas, da un hidrolizado que muestra la composición siguiente:

25 Fuera de la invención:

DP1: 2%, DP2: 77,9% DP3: 5,6%

Según la invención:

DP1: 5%, DP2: 88% DP3 < 1,5%

Fabricación de siropes de maltosa

30 Se realizan después 4 ensayos, que se refiere a la fabricación de siropes de maltosa a partir de 4 soluciones acuosas de beta-amilasa estabilizada. Se realizaron 3 ensayos según la invención y 1 ensayo de referencia utilizando unas soluciones estabilizadas que se almacenaron durante 90 días a 25°C antes de utilizarse.

35 Una leche de almidón, con una materia seca del 31%, se licúa de manera clásica con la ayuda del 0,2% de una alfa-amilasa (TERMAMYL 120L comercializada por la compañía NOVOZYMES) a un pH de 5,7 a 6,5 hasta un DE aproximadamente igual a 6.

Después, se calienta el medio de reacción durante algunos segundos a 140°C a fin de inhibir la alfa-amilasa, después se ajusta el pH entre 5 y 5,5 y la temperatura a 55°C.

40 La sacarificación está llevada a cabo con una materia seca del 35%, o ligeramente inferior, en presencia de pululanasa (PULLUZYME 750L comercializada por la compañía ABM) y de alfa-amilasa maltogénica (MALTOGENASE 4000L comercializada por la compañía NOVOZYMES) y de una solución acuosa de beta-amilasa, a dosis iguales al 0,1% sobre materia seca.

La solución acuosa de beta-amilasa consiste en el retenido de ultrafiltración, que tiene un contenido en peso seco de beta-amilasa igual al 15% de su peso total, como se ha descrito en el ejemplo anterior.

## ES 2 716 413 T3

En un primer ensayo fuera de la invención (CP), esta solución se ha estabilizado con el cóctel según la segunda columna de la tabla 1 (un 50% glicerol + un 0,2% SP + un 1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). La solución permaneció a una temperatura de 25°C durante 90 días antes de utilizarse como se ha indicado anteriormente.

- 5 En un segundo ensayo según la invención (EX1), esta solución se ha estabilizado con el cóctel según la última columna de la tabla 1 bis (un 40% glicerol + un 0,2% SP + un 0,2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). La solución permaneció a una temperatura de 25°C durante 90 días antes de utilizarse como se ha indicado anteriormente.

En un tercer ensayo según la invención (EX2), esta solución se estabilizó con el cóctel según la cuarta columna de la tabla 1 bis (un 40% glicerol + un 0,4% SP + un 0,2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). La solución permaneció a una temperatura de 25°C durante 90 días antes de utilizarse como se ha indicado anteriormente.

- 10 En un cuarto ensayo según la invención (EX3), esta solución se estabilizó con el cóctel según la tercera columna de la tabla 1 (un 40% glicerol + un 0,2% SP + un 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). La solución permaneció a una temperatura de 25°C durante 90 días antes de utilizarse como se ha indicado anteriormente.

Para estos ensayos, la sacarificación, que dura aproximadamente 72 horas, da un sirope de maltosa que muestra, para cada uno de los ejemplos, las composiciones siguientes:

- 15 Sirope de maltosa CP:

glucosa: 2%, maltosa: 77,9% maltotriosa: 5,6%

Sirope de maltosa EX1:

glucosa: 5%, maltosa: 88% maltotriosa: < 1,5%

Sirope de maltosa EX2:

- 20 glucosa: 3,2% - maltosa: 82,1% - maltotriosa: 3,7%

Sirope de maltosa EX3:

glucosa: 2,8% - maltosa: 81% - maltotriosa: 4,6%

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de estabilización de una solución acuosa de  $\beta$ -amilasa obtenida a partir de una fracción soluble de planta almidonera, que comprende al menos una etapa de introducción en dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa de:
- 5 a) del 0,05 al 0,5% de sorbato de potasio;  
b) del 30 al 50% de glicerol;  
c) del 0,05 al 0,5% carbonato de sodio
- expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado por que se introduce en dicha solución acuosa de  $\beta$ -amilasa:
- a) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de sorbato de potasio;  
b) del 35 al 45%, y preferiblemente alrededor del 40% de glicerol;  
c) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de carbonato de sodio;
- 15 expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución acuosa presenta un contenido en peso seco de  $\beta$ -amilasa comprendida entre el 5 y el 20%, preferiblemente entre el 10 y el 20%, muy preferiblemente igual a aproximadamente el 15% de su peso total.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el sorbato de potasio, el glicerol y el carbonato de sodio están en forma de soluciones acuosas.
5. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la solución acuosa de  $\beta$ -amilasa se obtiene por las etapas que consisten en:
- proporcionar una fracción soluble de plantas productoras de almidón;
- 25 - realizar sobre dicha fracción soluble una etapa de microfiltración a fin de obtener un permeado de microfiltración;  
- realizar sobre el permeado de microfiltración una etapa de ultrafiltración a fin de obtener un retenido de ultrafiltración.
6. Utilización, para mantener la actividad enzimática de  $\beta$ -amilasa en una solución acuosa, de:
- a) del 0,05 al 0,5% de sorbato de potasio;
- 30 b) del 30 al 50% de glicerol; y  
c) del 0,05 al 0,5% de carbonato de sodio,
- expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.
7. Solución acuosa de  $\beta$ -amilasa, que contiene:
- 35 a) del 0,05 al 0,5% de sorbato de potasio;  
b) del 30 al 50% de glicerol; y  
c) del 0,05 al 0,5% de carbonato de sodio,
- expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.
- 40 8. Solución acuosa según la reivindicación anterior, que comprende:
- a) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de sorbato de potasio;

## ES 2 716 413 T3

b) del 35 al 45%, y preferiblemente alrededor del 40% de glicerol;

c) del 0,1 al 0,3%, y preferiblemente alrededor del 0,2% de carbonato de sodio;

expresándose estos % en % en peso seco de cada constituyente con respecto al peso total de dicha solución acuosa.

5 9. Solución acuosa según una de las reivindicaciones 7 u 8, que presenta un contenido en peso seco de  $\beta$ -amilasa comprendido entre el 5 y el 20%, preferiblemente entre el 10% y el 20%, muy preferiblemente de aproximadamente el 15% de su peso total.

10 10. Utilización de la solución acuosa según una de las reivindicaciones 7 a 9, como aditivo alimentario, como agente digestivo, para la producción de edulcorantes, en farmacia para la producción de vacunas, y finalmente para la producción de maltosa y de siropes enriquecidos en maltosa.