

316318

P- 29.911

22 OCT. 1965

Belgian Patent
Nº 647.937



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

formulada el 10 de Agosto de 1.965, con el número 316.318

en

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD, entidad japonesa, establecida en 724, 3-chome, Takataminamicho. Toshimaku, Tokyo, Japón, por:

"UN METODO PARA OBTENER UNA PREPARACION DE CELULOSA A PARTIR DE UNA SOLUCION ENZIMATICA CLARIFICADA"

El presente invento se refiere a un nuevo método de preparar una celulosa altamente purificada a partir de la torta de levadura incubada de salvado de trigo, inoculado con un microorganismo del tipo Aspergillus negro, tal como el Aspergillus niger.

En el caso de extraer con agua la torta de levadura de salvado de trigo de un Aspergillus negro, por ejemplo, Aspergillus Niger, la solución extraída, en general, tiene un color pardo-negruzco, debido a la influencia de las esporas negras y a la humedad del medio de cultivo.

POOR
QUALITY



Además, es difícil clarificar el extrato, aun por centri-
fugación aunque la centrifugación se lleve a cabo a velo-
cidad elevada. Como resultado, el compuesto de celulasa
bruta, precipitado con un disolvente orgánico hidrofílico.
5 co, tal como etanol, toma color negro o blanco ceniza, y
ésto perjudica el valor del producto. Por otra parte, se
sabe que puede obtenerse un compuesto enzimático blanco
tratando el extracto coloreado según los métodos de de-
coloración convencionales antes de la precipitación, con
10 el disolvente orgánico hidrofílico. Sin embargo, estos -
métodos reducen generalmente de forma notable, la activi-
dad enzimática de la celulasa.

Es por ello, un objeto del presente invento crear
un nuevo y útil método de decolorar y purificar la solu-
15 ción de celulasa de enzima bruta, a partir de la torta de
levadura de salvado de trigo, inoculada por un microorga-
nismo del tipo Aspergillus negro, tal como Aspergillus -
niger.

Es un objeto más amplio, crear un método por el
20 cual, la enzima así decolorada y purificada, se obtiene
comparativamente con una actividad elevada, en comparación
con la enzima preparada a partir de la solución extraída
con agua directamente, en forma convencional.

Según el presente invento, la solución de enzima
25 bruta se decolora favorable y fácilmente, y se recupera
con una actividad elevada, secando primeramente la torta
de levadura cultivada y extrayéndola a continuación con
una solución acuosa ácida.

En la realización preferida, del presente invento, se em-
30 plea un microorganismo muy activo, productor de celulasa,



1960

el Aspergillus niger. La torta de levadura de salvado de trigo incubada, se seca una vez durante dos-cuatro horas a 55-65°C., y luego se extrae con solución de ácido láctico, ácido acético o ácido clorhídrico 1/10-1/50 molar.

5 La solución de enzima se obtiene en un estado altamente clarificado. La solución de enzima así obtenida, se trata con un disolvente orgánico hidrofílico para precipitar el compuesto de enzima.

10 El tratamiento de secado, es necesario para obtener un resultado satisfactorio, que tiene un efecto aumentado de decoloración. Por otra parte, aunque el tratamiento de secado se lleve a cabo durante muchas horas en el intervalo de 55-65°C., se obtiene poca reducción de la actividad enzimática. En caso de extraer el salvado de trigo cultivado con el ácido, después del tratamiento de secado, se obtiene un resultado más efectivo cuando se usa ácido diluido, que cuando se usa ácido concentrado.

15 La etapa de secado, según el invento, es también indispensable en el caso de que la extracción de la torta de levadura incubada se efectue con agua. La actividad
20 celulolítica y el grado de decoloración de la solución de celulasa de enzima bruta, y el compuesto de celulasa de enzima obtenido por extracción con agua o ácidos, después del secado, se muestran en la Tabla 1.

25

316318



Tabla 1

La actividad celulolítica y el grado de decoloración de la solución de celulasa de enzima bruta, y la celulasa de enzima obtenida por extracción con agua o ácido, después del secado.

(Nota.- "u/100 ml" = unidades por 100 mililitros;
"u/gr" = unidades por gramos)

Método de extracción	Actividad de la solución bruta de enzima	Rendimiento de celulasa de enzima	Actividad de la celulasa de enzima	Recuperación de la actividad	Color.
Extracción con agua sin secado previo	14.550 u/100ml	0,6890 gr/100 ml.	9.580 u/gr.	45,4%	Negro
Extracción con agua después del secado	13.810 u/100 ml.	0,5396 gr/100 ml.	13,050 u/gr.	51,0%	Blanco ceniza.
Extracción con ácido acético después del secado	14.070 u/100 ml.	0,5382 gr/100 ml.	14.630 u/gr.	56,0%	Blanco
Extracción con ácido láctico después del secado	13.950 u/100 ml.	0,5058 gr/100 ml.	14.290 u/gr.	51,8%	Blanco

316318



La cantidad de agua o ácido es 5 veces la cantidad del salvado de trigo en peso, y la pérdida en cantidad del salvado de trigo cultivado causada por el secado, se ajusta aumentando el volumen del extracto. Después de extraer durante 3 horas a 30°C., se ajusta el pH del extracto a 5,50 antes de añadirse el etanol a la solución del extracto hasta una concentración final del 70% en peso a la temperatura de 0°C.

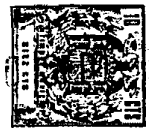
La Tabla II, muestra la actividad celulolítica y el grado de decoloración del compuesto de celulasa de enzima, obtenido por el mismo procedimiento que se describió en relación con la Tabla I, después de extraer la torta de levadura cultivada directamente por una solución ácida.

Tabla II

La actividad celulolítica y el grado de decoloración de la solución bruta de celulasa de enzima y la celulasa de enzima obtenida por extracción con agua o ácido, sin secado previo.

(Nota.- "u/100 ml" = unidades por 100 mililitros;
"u/gr" = unidades por gramo)

316318



Método de extracción	Actividad de la solución bruta de enzima	Rendimiento de celulasa de enzima	Actividad de la celulasa de enzima	Recuperación de la actividad	Color
Extracción con agua	7.200 u/100 ml	1,0359 gr/100 ml.	2.965 u/gr.	42,7%	Negro
Solución de ácido láctico.	N/50 7225 u/100 ml	0,9624 gr/100 ml.	4.100 u/gr.	54,6%	Blanco ceniza claro
	N/10 6940 u/100 ml.	0,6206 gr/100 ml.	5.300 u/gr.	47,6%	Blanco
Extracción con agua	11.750 u/100 ml.	0,8941 gr/100 ml.	6.460 u/gr.	49,2%	Negro
Solución de ácido acético	N/50 11400 u/100 ml.	0,8423 gr/100 ml.	7.500 u/gr.	57,8%	Blanco ceniza
	N/10 10940 u/100 ml.	0,8100 gr/100 ml.	7.210 u/gr.	51,1%	Blanco
Extracción con agua	8.850 u/100 ml.	0,7016 gr/100 ml.	4.560 u/gr.	36,4%	Negro
Solución de ácido clorhídrico	N/30 9.040 u/100 ml.	0,5.682 gr/100 ml.	8.250 u/gr.	51,8%	Blanco ceniza.
	N/10 8.700 u/100 ml.	0,5.562 gr/100 ml.	7.740 u/gr.	48,8%	Blanco ceniza.

En el caso de extraer la torta de levadura incubada con ácido orgánico o ácido mineral 1/10 N, durante 3 horas a 30°C., el pH de la solución extraída descenderá al valor de pH 3,0 aproximadamente. Sin embargo, la reducción de la actividad enzimática es casi despreciable.

Como se describió anteriormente, la solución bruta de enzima que se extrae de la torta de levadura cultivada

316318



con agua, después de haber sido desecada, o la solución
bruta de enzima que se extrae de la torta de levadura di
rectamente con un ácido orgánico o ácido clorhídrico, es
más clara que la solución extraída de la torta de levadu
ra directamente con agua.

El compuesto de enzima decolorado, se obtiene en
forma muy purificada de la solución de enzima, de forma
que la recuperación de la actividad enzimática del com
puesto de enzima, obtenido según el presente invento, es
mayor que la de la enzima obtenida por un método conven
cional.

El invento se da a conocer con nuevos detalles -
por los siguientes ejemplos, que se adjuntan con fines -
ilustrativos solamente, no intentándose limitar el inven
to en su espíritu o alcance.

Ejemplo 1

Se esterilizan durante 30 minutos a 125°C., 90 -
kilos de medio sólido preparado mezclando 5 partes en pe
so de salvado de trigo y 1 parte en peso de tamo con 3 -
partes en peso de agua. Después de enfriar a 40°C., se ino
culan dentro del medio esterilizado 0,5% en peso de torta
de levadura de Aspergillus Niger TPR-3.801. El salvado de
trigo inoculado se coloca en una incubadora durante 72 ho
ras a 30°C.

La torta de levadura así obtenida, se seca duran
te 3 horas a 60°C. después de agitar fuertemente, añadien
dose a continuación 265 litros de solución de ácido lácti
co 1/50 molar, en la cual la torta de levadura se empapa

316318



durante 3 horas a 30°C., después de lo cual, se filtra -
 por medio de una centrifuga Sharples, obteniéndose así -
 170 litros de solución bruta de enzima.

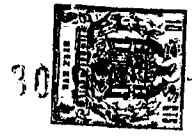
5 El pH de la solución de enzima, se ajusta a 5,50.
 con ácido clorhídrico, añadiéndose lentamente a continua-
 ción etanol del 95% a 0°C., hasta una concentración final
 del 70% en peso, después de lo cual, el conjunto se deja
 reposar durante la noche.

10 Se forma así, un precipitado que se separa por cen-
 trifugación por medio de una centrifuga Sharples, se reco-
 ge y se lava a continuación con etanol al 99% y se seca a
 30°C. a vacío. Como resultado, se obtienen del extracto -
 850 gramos de compuesto blanco de enzima que tiene 14.290
 unidades/gramo, que tiene una unidad celulolítica de 12.900
 15 unidades/100 mililitros. La recuperación de la actividad
 asciende a 51,2%.

Ejemplo 2

20 Se mezclan 5 partes de salvado de trigo y 1 parte
 de tamo con 3 partes de agua, esterilizándose durante 30
 minutos a 125°C. 90 kilogramos del medio sólido así prepa-
 rado, enfriándose después a 40°C., e inoculándose con 0,5%
 de torta de levadura de Aspergillus Niger TPR-3.801. El -
 25 salvado de trigo inoculado, se coloca en una incubadora du-
 rante 72 horas a 30°C.

La torta de levadura así obtenida, se envapa bien
 en 250 litros de solución acuosa de ácido acético 1/50 -
 molal, durante 3 horas a 30°C., y se filtra, obteniéndose
 30 así 160 litros de solución bruta de enzima.



La actividad celulolítica de la solución de enzima, es de 10.650 unidades/100 mililitros. La elaboración transcurre como en el ejemplo 1, obteniéndose 1.114 gramos de compuesto blanco de enzima, que tiene la actividad de 9.360 unidades/gramo. La recuperación de la actividad, asciende a 54,6%.

Ejemplo 3

A un medio cultivado de la misma forma que en el ejemplo 1, se añadieron 250 litros de solución de ácido clorhídrico 1/30 molar, en el cual se empapa el medio completamente durante 3 horas a 30°C. El rendimiento es de 160 litros de solución bruta de enzima. La actividad celulolítica de la solución de enzima, es de 10.890 unidades/100 mililitros.

La elaboración transcurre como en el ejemplo 1, - obteniéndose 1.120 gramos de compuesto blanco de enzima, que tiene la actividad de 8.250 unidades/gramo. La recuperación de la actividad asciende a 53,4%.

- o - e -

La "unidad" de la actividad celulolítica de los compuestos de enzima, obtenidos en los ejemplos 1, 2 y 3 se calcula como sigue:

La actividad que reduce la viscosidad de 25 mililitros de 0,8% en peso de carboximetilcelulosa (substrato), a la mitad, durante 1 minuto a una temperatura de 40°C.,

316318



se determina es igual a una unidad. El substrato, se hace adicionando isovolumétricamente una solución tampoon de ácido acético 0,1 molal a una solución acuosa de carboximetilcelulosa de 1,6% en peso.

5 Según esto, cuando A miligramos de una muestra de enzima reduce a la mitad la viscosidad del substrato anterior durante T segundos, la unidad de actividad celulolítica de esta enzima por gramo, se calcula según la fórmula siguiente:

10

$$\text{Unidad de actividad celulolítica} = 25 \times \frac{1}{A} \times \frac{60}{T} \times 10^3$$

N O T A

15

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada ni divulgada en España, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Introducción, por DIEZ años, son los siguientes:

20

1.- Un método para obtener una preparación de celulasa a partir de una solución enzimática clarificada por extracción con disolvente desde la torta de levadura incubada de un microorganismo *Aspergillus Niger* que produce celulasa, cuyo método comprende la mejora de someter la torta de levadura incubada antes del tratamiento de extracción con disolvente a secado durante dos a cuatro horas a 55-65°C., obteniéndose así una celulasa decolorada de gran pureza y de una actividad delulolítica o de desdoblamiento de la celulosa mejorada.

30

2.- Un método para obtener una preparación de celu

316318



5
10
15
20
25
30

lasa a partir de una solución enzimática clarificada por extracción con disolvente por medio de agua a partir de la torta de levadura incubada de un microorganismo *Aspergillus Niger* que produce celulasa, cuyo método comprende la mejora de someter la torta de levadura incubada antes del tratamiento de extracción con disolvente a secado durante 2 a 4 horas a 55-65°C., obteniéndose así una celulasa decolorada de gran pureza y de una actividad celulólitica o de desdoblamiento de la celulosa mejorada.

3.- Un método para obtener una preparación de celulasa a partir de una solución enzimática clarificada por extracción con disolvente a partir de la torta de levadura incubada de un microorganismo *Aspergillus Niger* que produce celulasa, cuyo método comprende la mejora en la que se efectúa la extracción con disolvente con ácido acuoso diluido seleccionado del grupo que consta de ácido láctico, ácido acético y ácido clorhídrico, siendo la concentración del ácido de 1/10 M - 1/50 M, obteniéndose así una celulasa decolorada de gran pureza y de una actividad celulólitica o de desdoblamiento de la celulosa mejorada.

4.- Un método para obtener una preparación de celulasa a partir de una solución enzimática clarificada por extracción con disolvente a partir de la torta de levadura incubada de un microorganismo *Aspergillus negro* que produce celulasa, cuyo método comprende la mejora en la que se efectúa la extracción con disolvente con ácido acuoso diluido seleccionado del grupo que consta de ácido acético, ácido láctico y ácido clorhídrico, siendo la concentración del ácido 1/10 M - 1/50 M, y en el que la torta de levadura incubada es sometida antes de la extracción con disolvente a



secado durante 2 a 4 horas a 55-65°C., obteniéndose así -
una celulasa decolorada de gran pureza y de una actividad
celulolítica o de desdoblamiento de la celulosa mejorada.

5 5.- El método de la reivindicación 1, en el que el
microorganismo es *Aspergillus Niger*.

6.- El método de la reivindicación 2, en el que el
microorganismo es *Aspergillus Niger*.

7.- El método de la reivindicación 3, en el que el
microorganismo es *Aspergillus Niger*.

10 8.- El método de la reivindicación 4, en el que el
microorganismo es *Aspergillus Niger*.

9.- Un método para obtener una preparación de celu
losa a partir de una solución enzimática clarificada.

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

La presente Memoria consta de doce hojas escritas
a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

2 OCT. 1965

P.A.

Alonso de Elzabete
P. A. P. A.

316318