



10  
323766

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 3 de Marzo de 1966, con el nº 323.766

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

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

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AMILASA ESTABLE Y ACTIVA EN MEDIO ACIDO"

-----  
Esta invención se refiere a una nueva y útil preparación de amilasa y a un procedimiento para su preparación.

Más particularmente, esta invención se refiere a una preparación de amilasa activa y estable en medio ácido, derivada de una nueva cepa de un microorganismo que pertenece al Paecilomyces subglobosum, como nuevo y útil producto y procedimiento más avanzado para la preparación de la nueva enzima.

5  
10

Hasta ahora se sabía que existían varias cla

323766



ses de microorganismos para producir varios tipos de enzima amilolítica, y, entre ellos, algunas cepas se han utilizado ampliamente en la industria, por ejemplo el grupo Aspergilli amarillo-verdoso, tal como el Aspergillus eryzae, y el grupo Aspergilli negruzco, tal como el Aspergillus usamii, Aspergillus awamori y Aspergillus niger, una cierta cepa del grupo Rhizopus, y bacterias tales como el Bacillus subtilis.

Generalmente se han encontrado algunas diferencias en las propiedades enzimáticas entre las anteriores preparaciones microbianas de amilasa.

Por consiguiente, al emplearlas pueden considerarse según cada una de sus propiedades características, por ejemplo intervalo activo de pH, estabilidad frente a pH, tal como estabilidad en medio ácido y estabilidad en medio alcalino, estabilidad frente al calor, y modalidad de la actividad amilolítica.

Muchas preparaciones de amilasa derivadas de varios microorganismos han mostrado poseer, en la actividad amilolítica, dos clases de actividades típicas a saber, funciones dextrinógena y sacarificante frente al almidón.

Algunas preparaciones de amilasa que tienen tal actividad en medio ácido y estabilidad en medio ácido de las funciones dextrinógena y sacarificante, son adecuadas para varios usos en el caso de emplearlas en medio ácido, y especialmente adecuadas para una enzima digestiva que actúa frente al almidón de la dieta alimenticia en el estómago, donde el jugo gástrico proporciona un medio fuertemente ácido.

323766



Akaboli y otros (Symposium de Química Enzimática en Japón, Vol. 7, p. 107, 1952) informaron que una preparación de amilasa derivada del *Aspergillus eryzae* era activa a pH comprendido entre 4,0 y 7,0 en su actividad dextrinógena, y que era fácilmente inactivada a pH inferior a 3,0, y por otro lado, en *Hakko Kogaku Zasshi* (J. Fermentation Technology in Japan), Sakamoto y otros demostraron que el grupo *Rhizopus* produce una amilasa que, en su actividad dextrinógena, tiene un pH activo óptimo próximo a pH 5,0.

Según el informe de Minoda (J. Agr. Cem.Soc. Japan vol 29, p. 115,(1955), Vol 35, p. 479 y 482, (1961), memoria descriptiva de la Patente Japonesa Nº 35-5046, y Agr. Biol. Cen. Vol 37, Nº 11, p. 809 (1963), se había supuesto ya que las amilasas se derivaban de cepas que pertenecen al *Aspergillus niger*, y que, entre las preparaciones de amilasa así obtenidas, la actividad dextrinógena estaba fundamentalmente a un pH mayor de 4,0, y también que son suficientemente estables en el medio ácido.

No obstante, las formas comerciales de las preparaciones de amilasa según los métodos de las técnicas anteriores o de otras técnicas descritas en la página 9, no muestran ni actividad amilolítica deseable, ni estabilidad en un medio ácido de un pH inferior a 4,0 (véanse figuras 1, 2, 3 y 4).

Por el contrario, muestras nuevas cepas, *Paeecilomyces subglobosum* TPR-3810 y TPR-3811, empleadas en esta invención, pueden producir una preparación de amilasa activa en medio ácido y estable en medio ácido, que tiene actividades dextrinógena y sacarificante más fuer-

323766



tes y más estables a un pH ácido de más de 3,0, y muestran además sus actividades deseables a pH 2,5 (véanse las tablas que se describen en la pág. 11).

5 Por lo tanto, puede decirse, como conclusión,  
que muestra nueva preparación de amilasa es activa a pH  
comprendido entre 2,5 y 6,0 y, particularmente, más fuer-  
te que otras preparaciones a pH comprendido entre 2,5 y  
3,5, y es también estable a pH comprendido entre 3,5 y  
9,0, y, particularmente, más estable que las demás en sus  
10 actividades dextrinógena y sacarificante a pH compendi-  
do entre 3,5 y 5,0 (véanse figuras 1,2,3 y 4).

Habíamos descubierto anteriormente un méto-  
do de producir una nueva enzima digestiva estable en me-  
dio ácido usando una cepa conocida que pertenece al grupo  
15 Paecilomyces varioti (Patente japonesa Nº 421.345, su Me-  
moria descriptiva publicada Nº 38-25280 y Nº de Serie de  
solicitud U.S. 322.583, Yakuzaigaku (The Achives of Prac-  
tical Pharmacy) Vol 22, p 111-129, y Chem. Abstracts Vol  
58, 4770 b), pero no sirvió de un modo satisfactorio a  
20 nuestro propósito de obtener la preparación de amilasa ac-  
tiva y estable en medio ácido (véanse figuras 9 y 10).

Como resultado de la investigación, hemos des-  
cubierto ahora dos nuevos microorganismos que producen la  
anterior preparación de amilasa que actúa a un pH ácido .  
25 comprendido entre 2,5 y 4,5, siendo el pH óptimo de 4,0  
a 4,5 entre varios microorganismos que pertenecen al gru-  
po Paecilomyces subglobosum.

Los nuevos microorganismos, diferentes del  
Paecilomyces varioti, se han clasificado con los nombres  
30 de Paecilomyces subglobosum TPR-3810 y TPR-3811, cuya exis

323766 10 DIC



tencia no se había probado hasta ahora.

Es un objeto de esta invención aislar los nuevos microorganismos que producen una preparación de amilasa activa y estable en medio ácido.

5 El objeto principal de esta invención es obtener la excelente enzima que tiene la actividad amilolítica activa y estable en medio ácido anteriormente indicada, empleando los nuevos microorganismos, Paecilomyces subglo-  
10 bosum TPR-3810 y TPR-3811, y las demás cepas que tienen las mismas características biológicas que el TPR-3810 y el TPR-3811.

Otro objeto de esta invención es obtener fácilmente la nueva y útil preparación de amilasa.

15 Los nuevos microorganismos de esta invención se aíslan a partir de hongos silvestres por medio del siguiente procedimiento de separación, que sirve satisfactoriamente para nuestro propósito.

#### METODO PARA EL AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

##### 1ª operación:

20 Se coloca en placas Petri un medio de cultivo de agar de Czapek-Dox modificado; como fuente de carbono, 0,5% de almidón soluble; como fuente de nitrógeno, 0,5% de peptona; 0,1% de fosfato de dihidrógeno y potasio; 0,05% de cloruro de potasio; 0,05% de sulfato de magnesio;  
25 0,001% de sulfato ferroso, ajustándose el pH a 3,0 y se exponen a la atmósfera exterior o interior, o bien varias muestras de tierra vegetal recogidas en la ciudad de Tokyo

323766



en varias ocasiones, sin tapas, y después se cultivan.

2ª operación:

Se seleccionan 500 cepas entre muchas cepas que se han desarrollado, después se seleccionan 50 cepas, que producen una amilasa tal que actúa a pH 3,0, entre 500 cepas cultivadas en el medio de cultivo de agar de Czapek-Dox modificado, a 30°C durante 3 días y con agitación, con 3% de glucosa como fuente de carbono; 2% de peptona como fuente de nitrógeno; 0,1% de fosfato de dihidrógeno y potasio, 0,05% de cloruro de potasio, 0,05% de sulfato de magnesio y 0,001% de sulfato ferroso, como sales inorgánicas.

3ª operación:

Entre las 50 cepas deseadas que producen tal amilasa activa y estable en medio ácido que actúa a pH 3, se seleccionan además en estado puro, para su empleo en esta invención, dos microorganismos que producen la amilasa activa en medio ácido más fuerte y más estable.

De las observaciones morfológicas puede decirse que muestras nuevas cepas pertenecen a cierta especie, y que además tienen características perfectamente idénticas en:

- i) Las actividades y propiedades de la amilasa que producen en un medio líquido de cultivo

25

323766



ii) La producción de los mismos pigmentos de color pardo pálido en el medio de cultivo,

iii) la disponibilidad de nitritos.

Las características morfológicas de los nuevos microorganismos descubiertos, Paecilomyces subglobosum TPR-3810 y TPR-3811, son como sigue.

MORFOLOGIA DE NUESTROS NUEVOS MICROORGANISMOS

Se realizaron observaciones coloniales de los microorganismos de las colonias nacidas sobre las placas de agar.

Se llevaron a cabo estudios morfológicos detallados del desarrollo de los micelios, sobre cristales porta-objetos.

(1) Colonias:

superficie ..... lisa  
color ..... pardo verdoso o  
pardo amarillento

(2) Parte formadora de la espora:

similar al género Paecilomyces, varios esterigmatos, surgiendo en parte individualmente, y en parte formando 2 ó 4 de los mismos un verticilo, con algo de desarrollo excepcionalmente denso, dando un aspecto irregular parecido al penicillus.

323766



(3) Esterigmatos:

5

son de forma muy parecida, usualmente con un estrechamiento en el centro, con unas dimensiones medias de 21 x 3,5 micras, y con una superficie ligeramente rugosa.

(4) Conidios:

10

forman una cadena larga desde el vértice de los esterigmatos globulares o subglobulares, y algunas veces elípticos. Miden por término medio 5,5 x 3,6 micras, y tienen superficie un poco rugosa.

(5) Penicillus:

No se observan los típicos.

(6) Métulas o ramificaciones:

15

Cuando las hay, no son tan definidas o diferenciadas, y miden, en promedio, 12 x 3,5 micras.

(7) Conidióforo:

20:

De un tamaño medio de aproximadamente 20 x 4 micras.

(8) Macrosporo:

Se ven en ocasiones en los medios, y son subglobulares; en su mayoría, de 8 x 10 micras.

323766



(9) Esclerotios, peritecios o ascosporos ..... ninguno

5

(10) Micelios aéreos que surgen como un funicular, y exudación similar a gelatina, como se observa en el cultivo de Paecilomyces varioti , ..... ninguno

10

Por medio de nuestros microorganismos que sugerimos como similares a la especie de Paecilomyces varioti, los estudios detallados aclaran las diferencias entre ellos.

DIFFERENCIAS MORFOLOGICAS ENTRE NUESTRAS CEPAS Y EL PAECILOMYCES VARIOTI

(1) Conidios:

15

forma ..... más globular, no tan elíptica  
superficie ..... un poco más rugosa

(2) Esterigmatos:

20

forma ..... un poco más estrechos en el centro, no tan suavemente ahusados.  
superficie ..... un poco más rugosa

(3) Regularidad de las piezas formadoras de esporas:

irregulares, a veces los esterigmatos están más densamente distribuidos, mostrando un aspecto parecido a penicillus.

323766



De las características mencionadas anteriormente, deducimos que nuestros microorganismos pertenecen al género *Paecilomyces*, y a una especie que no debe pertenecer al *Paecilomyces varioti*.

5 Por tanto, interpretamos que son una nueva especie del género *Paecilomyces*, y los denominamos *Paecilomyces subglobosum* TPR-3810 y TPR-3811, respectivamente.

#### METODO DE PRODUCIR LA AMILASA ESTABLE EN MEDIO ACIDO

10 Según uno de los aspectos de esta invención, la nueva y útil amilasa puede producirse cultivando nuestros recientemente descubiertos microorganismos, *Paecilomyces subglobosum* TPR-3810 y TPR-3811, en un medio nutricional apropiado, en las mismas condiciones que las de la forma convencional.

15 En esta invención, hemos estudiado y establecido un método de cultivo modificado, ya que conduce a buenos resultados, dado el hecho de que la cantidad y actividad obtenibles de la amilasa están influenciadas esencialmente por los componentes del medio de cultivo empleado.

20 El medio contiene, esencialmente, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y trazas de elementos inorgánicos, cada uno de ellos en la cantidad apropiada, como sustancias nutricias.

#### i. Medio líquido de cultivo

25 Ejemplos de las fuentes de carbono más adecuadas para el medio de cultivo son 5% de varias clases de al

323766



midón ó 5% de maltosa, pero pueden emplearse también glucosa, sacarosa, dextrina, glicerina y harina de trigo, en proporciones de 5% de cada uno de estos, en lugar del almidón o la maltosa.

5 La fuente de nitrógeno adecuada es 3% de peptona, y subsidiariamente pueden emplearse harina cruda de glicina, glicina desgrasada, levadura seca, líquido de maceración de maíz, en proporción del 3%.

Elementos inorgánicos adecuados son:

10 Sulfato de magnesio ..... 0,05%  
Sulfato ferroso ..... 0,01%  
Cloruro de potasio ..... 0,1%  
Fosfato de dihidrógeno y potasio .. 0,2%

15 El medio líquido de cultivo se completa mezclando los anteriores componentes con agua (Estos componentes se emplean como medio líquido principal de cultivo o medio líquido de cultivo para sembrar Koji).

20 Después es deseable ajustar el valor del pH del medio a pH 6,0, una vez que cada una de estas sustancias se ha añadido al medio.

El máximo rendimiento y la elevada actividad amilolítica de la amilasa que puede obtenerse, han de conseguirse en las siguientes condiciones de tratamiento del cultivo:

25 En el depósito de cultivo:

Velocidad de aireación ..... 4/3 v/v/min  
Agitación ..... 350 r.p.m.  
Temperatura ..... 30°C

323766



Tiempo de cultivo ..... aproximadamente  
90 a 94 horas.

5 El medio así preparado se trata y se esteriliza, y se inocula con medio de cultivo de siembra de Paecilomyces subglobosum TPR-3810 ó TPR-3811, que se preincuban en el medio que contiene los mismos componentes que se han indicado anteriormente, durante 70 horas, y después se lleva a cabo la operación de cultivo (cultivo sumergido) durante 90 a 94 horas, con aireación.

10 ii. Medio sólido de cultivo

La base del medio sólido de cultivo se prepara por medio de los siguientes componentes: salvado de trigo:paja:agua en la proporción 5:3:4. El medio sólido de cultivo así preparado se esteriliza y se inocula con medio  
15 de cultivo de siembra de Paecilomyces subglobosum TPR-3810 o TPR-3811, después se coloca en forma de pilas el medio así inoculado, y después se cultiva a 30°C durante 70 horas aproximadamente. (De modo similar, estos componentes se emplean como medio sólido principal de cultivo o medio  
20 sólido de cultivo para sembrar koji).

SEPARACION DE LA AMILASA DESEADA

La separación una amilasa altamente purificada y activa del medio de cultivo y de la solución sometida a extracción, ha de realizarse también según el siguiente  
25 procedimiento, (a) y (b), ajustando el pH a un valor de

323766



aproximadamente 6'0.

a) Procedimiento de precipitación

5 La precipitación de la amilasa deseada se facilita por adición de disolventes orgánicos hidrofílicos tales como etanol y acetona, o sulfato de amonio.

Si se desea emplear el procedimiento de precipitación citado, los siguientes tratamientos pueden llevar a buenos resultados: adición de etanol hasta 65% a la concentración final, o adición de acetona hasta 55% a la  
10 concentración final si se emplea acetona, y, en el caso del sulfato de amonio, adición de éste hasta 0'8 de su saturación a la concentración final.

ii) Procedimiento de adsorción

15 Si se desea emplear este método, pueden emplearse ventajosamente adsorbentes tales como el cambiador de iones DEAE-Sephadex, cambiador de iones DEAE-celulose (Marca de fábrica registrada, producido por "Pharmacia", en Suecia) y sustancias similares.

20 Un medio de cultivo, o disolución sometida a extracción, de la amilasa es adsorbido en el cambiador de iones tratado previamente con disolución tamponadora de fosfato 0,05 M, de pH 7,0.

El material así adsorbido es eluído con disolución tamponadora de citrato de sodio 0,25 M, de pH 4,0.

25 La elución así ajustada se trata por el mis-

323766



mo procedimiento anterior de precipitación (i) para obtener la enzima deseada.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA

5 Se compara la actividad amilolítica de nuestra nueva preparación de amilasa, con las de las preparaciones comerciales de amilasa A, B, C, y D siguientes.

10 Preparación A de amilasa.... preparación de amilasa que se vende con la marca de fábrica registrada de "Sanac-tase", derivada del *Aspergillus niger* (Memoria descriptiva publicada de patente japonesa Nº 35-5046) por Meiji Seika Co. en Japón.

15 Preparación B de amilasa.... Preparación de amilasa que se vende en Japón con la Marca de fábrica registrada de "Stalase", por la Noda Sangyo Co., y que se deriva del *Aspergillus aures* (Memoria descriptiva publicada de patente japonesa Nº 39-12284.

20  
25 Preparación C de amilasa.... Preparación de amilasa que se vende en América por la Wallerstein Co. con la marca de fábrica registrada de "Mylase 100", derivada del *Aspergillus oryzae*.

323766



Preparación D de amilasa.... Preparación de amilasa ven-  
dida en Japón por la Sankyo  
Co, con la marca de fábrica  
de "Taka Diastase", deriva-  
da del *Aspergillus oryzae*.

5

Los resultados de estas determinaciones se  
muestran en las figuras 1 a 12 anexas, y en los siguientes  
párrafos.

#### 1. Curvas de actividad de pH de la amilasa

10

Se ha determinado la actividad digestiva de  
nuestra nueva preparación de amilasa a varios pH, como se  
muestra en las figuras 1 y 2. La preparación de amilasa  
derivada del *Paecilomyces subglobosum* TPR-3810 y TPR-3811  
tiene poder destrínógeno y sacarificante a pH comprendido  
entre aproximadamente pH 2'5 y pH 6'0, y particularmente  
más excelente actividad a pH comprendido entre pH 3'0 y  
6'0. actividades sustancialmente más fuertes que las de-  
más a pH comprendido entre 2'5 y 3'5, y sus óptimos pH  
a aproximadamente pH 4'0 a 4'5.

15

20

Por el contrario, las anteriores preparaciones  
comerciales de amilasa tienen un medio óptimo a pH 5'0.

25

Como resultado de estas determinaciones, se ha  
comprobado que la actividad de nuestras nuevas prepara-  
ciones de amilasa es mejor, en medio ácido, que la de las  
demás.

#### 2. Curvas de estabilidad de pH de la amilasa.

323766



Los poderes dextrinógeno y sacarificante de nuestras nuevas preparaciones de amilasa son muy estables a pH comprendido entre aproximadamente pH 3'5 a 9'0, en comparación con las anteriores preparaciones comerciales de amilasa, cuyo pH estable es de 5'0 a 9'0, como se muestra en las figuras 3 y 4.

Como consecuencia, nuestras nuevas preparaciones de amilasa muestran más excelente estabilidad y actividad en medio ácido.

10    3. Temperatura óptima de actividad amilolítica a pH  
4'0 a 4'5

Nuestras nuevas preparaciones de amilasa.... 50°C  
Preparaciones comerciales de amilasa..... aproximada-  
mente 40°C

15    4. Estabilidad al calor de la actividad amilolítica a pH  
4'0 a 4'5

Todas las preparaciones comerciales de amilasa son estables a menos de 40°C, pero nuestras nuevas preparaciones de amilasa son más estables que las preparaciones comerciales de amilasa a 50°C.

Además, se han hecho otros ensayos para comparar las actividades amilolíticas y las características entre nuestras nuevas cepas y el Paecilomyces varioti TPR-220, que se parecen mucho a otras en sus caracteres morfológicos.

Las diferencias, y la superioridad de nuestras

323766



nuevas preparaciones de amilasa pueden comprenderse a partir de las tablas siguientes, y del hecho de que todas las preparaciones de amilasa que se derivan de nuestra invención muestran mejores efectos en las actividades dextrinógena y sacarificante, como se muestra en las figuras 9 a 12.

5. Diferencias entre la actividad de pH y la temperatura activa

	Actividad de pH		Actividad de temperatura
	Intermedio activo	pH óptimo	(Temp. óptima)
Nuestra nueva amilasa (según ej. 2)	PH2.5 - 7.0	PH4.0 - 4.5	50°C
Nuestra nueva amilasa (según ej. 1)	"	"	"
Amilasa de Paecilomyces varioti TPR-220	PH3.0 - 7.0	PH5.0	50 - 60°C

	Poder dextrinógeno (a pH 4'0-4'5)		Poder sacarificante (a pH 4'0-4'5)	
Nuestra nueva amilasa (según ej. 2)	70,000 unidades/g		110,000 unidades/g.	
Nuestra nueva amilasa (según ej. 1)	200,000	"	220,000	"
Amilasa de Paecilomyces varioti TPR-220	4,000	"	13,000	"

323766 100



## Actividades amilolíticas

	Poder dextrinógeno		Poder sacarificante	
	PH 2.5	PH 3.0	PH 2.5	PH 3.0
Nuestra nueva amilasa (según ej. I)	Unidades/g 80,000	Unidades/g 160,000	Unidades/g 60,000	Unidades/g 120,000
Preparación A de amilasa	<	10,000	<	12,000
Preparación B de amilasa	<	5,000	<	10,000
Preparación C de amilasa	<	20,000	<	10,000
Preparación D de amilasa	<	4,000	<	7,000

Además, nuestros nuevos microorganismos pueden producir ventajosamente las preparaciones de amilasa activas y estables en medio ácido, tanto en el medio líquido de cultivo como en el medio sólido de cultivo; por el contrario, el *Paecilomyces varioti* TPR-220 solamente puede producir una amilasa en un medio sólido de cultivo (no produciéndola en un medio líquido de cultivo).

CALCULO DEL PODER DEXTRINOGENO Y DEL PODER SACARIFICANTE

En esta invención, los poderes dextrinógeno

323766



y sacarificante se calcularon por medio de las determinaciones siguientes:

i) Poder dextrinogeno en almidón: ensayo por el método del índice de azul.

5                    1 ml de una preparación de amilasa se añadió a 10 ml de una disolución de almidón soluble al 2%, que contenía una cantidad mitad de disolución tamponadora de citrato de sodio 1/10 M, y se mantuvo a 40°C durante 30 minutos.

10                   Tomando una muestra de 1 ml. de la mezcla, se añadió a la mezcla 1 ml de ClH 1 N para detener la reacción continuada, y después se añadieron 10 ml de disolución de yodo 1/5000 N.

15                   Se hizo un ensayo para determinar la densidad óptima de la muestra. (longitud de onda: 660 milimicras; capa de absorción: 1 cm.)

Se llevó a cabo un ensayo en blanco por el mismo procedimiento, empleando agua destilada en lugar de la disolución de encima.

20                   UNIDADES DE PODER DEXTRINOGENO ===

$$\frac{\text{Valor del ensayo en blanco} - \text{Valor del ensayo}}{\text{Valor del ensayo en blanco}} \times 1000 \times \frac{1}{30}$$

$$\frac{1000}{n}$$

donde n = mg. de preparación de encima empleados.

25                   En esta determinación, la unidad se basa en el poder dextrinogeno necesario para disminuir la reacción de color azul en 10 ml de almidón soluble al 2% a 0'1%



por minuto a 40°C, con lo que el valor se calcula como una unidad, y prácticamente es permutado por la unidad por g. de la preparación de amilasa utilizada.

ii) Poder sacarificante: ensayo por el método del yodo

5                   1 ml. de disolución de amilasa se añadió a 20 ml de disolución de almidón soluble al 2% que contenía una cantidad mitad de disolución tamponadora de citrato de sodio 1/10 N, y se mantuvo a 40°C durante 2 horas.

10                   Se añadieron 20 ml de disolución de yodo 1/10 N y 20 ml de NaOH 1/5N y después se mantuvo en reposo a la temperatura ambiente.

                  Después de reposar durante 20 minutos, se añadieron 4 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 N, y se valoró el yodo libre con  $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$  0'1 N.

15                   De modo similar, se llevó a cabo un ensayo en blanco por el mismo procedimiento en el que no se añadió la disolución de encima, después de la adición de la disolución de yodo.

20                   Esta unidad se basa en el poder necesario para sacarificar 20 ml de almidón soluble al 2% a 40°C, con lo que el valor se calcula como una unidad cuando se produce 1 mg de glucosa empleando 1 g de la amilasa en la valoración de yodo.

25                   Los siguiente ejemplos ulustran el método adecuado para la preparación de la amilasa, pero no han de considerarse como limitación de la invención.

Ejemplo I

323766



1ª operación:

Medio líquido de cultivo para sembrar Koji

	Almidón de patata	100 g
	Peptona	60 g
5	Fosfato de dihidrógeno y potasio	4 g
	Cloruro de potasio	2 g
	Sulfato de magnesio	1 g
	Sulfato ferroso	0'2 g

10 Los materiales anteriores se disuelven en 2 litros de agua, y se ajusta el valor del pH a pH 6'0 con ClH concentrado.

Después de esterilizar el medio a 125°C durante 10 minutos, se preincuba un cultivo de Paecilomyces subglobosum TPR-3810 en el medio líquido de cultivo anterior para sembrar Koji, a 30°C y durante 70 horas, con un aparato de agitación giratorio.

15 La preincubación dio una siembra Koji de Paecilomyces subglobosum TPR-3810.

2ª operación:

20 Medio líquido principal de cultivo

	Almidón de patata	5 kg
	Peptona	3 kg
	Fosfato de dihidrógeno y potasio	200 g
	Cloruro de potasio	100 g
25	Sulfato de magnesio	50 g
	Sulfato ferroso	10 g
	Agua	100 litros

323766



Los anteriores materiales se mezclan, y se ajusta el valor del pH a pH 6'0 con ClH concentrado.

De modo similar, el medio se esteriliza a 125°C durante 10 minutos. La siembra Koji preincubada por medio de la primera operación se inocular en el medio líquido principal de cultivo, y se cultiva en el depósito de cultivo en las condiciones siguientes: Temperatura, 30°C; velocidad de aireación, 130 litros por min.; agitación, 350 r.p.m., y tiempo de cultivo, 94 horas.

El medio de cultivo se centrifuga después para separar los hongos, y con la centrifugación se obtienen 60 litros de líquido que sobrenada que contiene una amilasa activa y estable en medio ácido.

El valor del pH del líquido que sobrenada así obtenido se ajusta a pH 6'0, y se añaden al líquido que sobrenada 130 litros de alcohol del 95% enfriado a -20°C, para conseguir una precipitación de la amilasa.

La sustancia precipitada se lava suficientemente con etanol y se seca en vacío a 30°C.

De la preparación se obtienen 180 g. de preparación de amilasa en polvo, que tiene un poder dextrínico de 200.000 - 205.000 unidades/g. a pH 4'0 a 4'5, y un poder sacarificante de 210.000 - 220.000 unidades/g a pH 4'0 a 4'5.

25

#### Ejemplo II

1ª operación:

Medio sólido de cultivo para sembrar Koji

Salvado de trigo 500 g.

323766



Paja 300 g  
Agua 400 ml

Se mezclan los materiales anteriores.

Después de esterilizarlo a 125°C durante 30 minutos, se preincuba un cultivo de Paecilomyces subglobosum TPR-3811 en el medio sólido de cultivo anterior para sembrar Koji, a 30°C durante 70 horas. La preincubación da una siembra Koji de Paecilomyces subglobosum TPR-3811.

2ª operación:

10 Medio sólido principal de cultivo  
Salvado de trigo 50 kg  
Paja 30 kg  
Agua 40 litros

15 Los materiales anteriores se mezclan para hacer la base del medio sólido principal de cultivo.

De modo similar, el medio se esteriliza a 125°C durante 30 minutos.

20 La siembra Koji preincubada por medio de la 1ª operación se inocula en el medio sólido principal de cultivo, y se deja cultivar a 30°C durante 70 horas.

Al medio de cultivo se añaden 250 litros de agua para extraer la amilasa.

25 Después de una extracción a 30°C durante 3 horas y de una centrifugación posterior, se obtienen 150 litros de disolución transparente que contiene una amilasa activa y estable en medio ácido.

La disolución así obtenida se mezcla con 330

323766



litros de etanol del 95% enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para conseguir una precipitación de la amilasa.

La sustancia precipitada se lava con etanol, y se seca en vacío a  $30^{\circ}\text{C}$ .

5 De la sustancia precipitada se obtienen 900 g de preparación de amilasa en polvo, que tiene un poder dextrinógeno de 70.000 unidades/g a pH 4'0 a 4'5, y un poder sacarificante de 110.000 unidades/g a pH 4'0 a 4'5.

10 Las amilasas activas a los ácidos y estables a los ácidos de la presente invención son útiles, en virtud de sus superiores actividades amilolítica, dextrinogénica y sacarificante, en campos extensos, por ejemplo como digestivo para medicamentos, para tratamientos previo de materiales para preparar alimentos, como enzima  
15 para madurar materiales durante la producción, como clarificante de alimentos fermentables, tales como cerveza, sake (vino japonés), vinagre y similares, como un ablandador de res o cereales antes de cocer, así como para otros fines para los que se utilizan convencionalmente  
20 amilasas. Las presentes amilasas son, sin embargo, especialmente adecuadas para utilización en condiciones ácidas, y particularmente como enzima digestiva, que actúa contra el almidón dietético del estómago, donde el jugo gástrico proporciona un estado fuertemente ácido.

25 Un cultivo de Paecilomyces subglobosum, cepa TPR-3811, está depositado en American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, bajo la entrada ATCC Núm. 16492. Un cultivo de Paecilomyces subglobosum, cepa TPR-3810, está igualmente depositado bajo la entrada ATCC Núm.  
30 16493.

323766



La presente solicitud, que corresponde a la presentada en el Japón, el 4 de Marzo de 1965, bajo el número 12114/65, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

10

1.- Un procedimiento para la preparación de amilasa estable y activa en medio ácido, que tiene una excelente actividad amilolítica en medio ácido, que comprende, en combinación, las operaciones de: preincubar uno de los nuevos microorganismos, del grupo de Paecilomyces subglobosum en un medio de cultivo líquido o sólido esterilizado para sembrar Koji, a 30°C durante 70 horas en un estado aeróbico, y obtener una siembra de Koji del grupo Paecilomyces subglobosum; inocular y cultivar la siembra Koji del grupo Paecilomyces subglobosum en el medio sólido o líquido principal de cultivo a 30°C en un estado aeróbico, hasta que la amilasa activa y estable en medio ácido se acumula en el medio de cultivo, y separar del medio de cultivo la amilasa activa y estable en medio ácido, por precipitación o adsorción.

15

20

2.- Un procedimiento según la reivindicación

323766



ción 1, en el que el cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 70 a 90 horas.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que los nuevos microorganismos son el Pae-  
5 cilomyces subglobosum TPR-3810 (ATCC Nº 16493) o el Pae-  
cilomyces subglobosum TPR-3811 (ATCC Nº 16492)

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio líquido principal de cultivo y el medio líquido de cultivo para sembrar Koji son me-  
10 dios acuosos y contienen: (a) una fuente de carbono elegida del grupo que consiste en almidón y maltosa, en una cantidad total de 5% en peso; (b) una fuente de nitrógeno constituida por peptona en una cantidad total de 3% en peso; y (c) 0,05% de sulfato de magnesio, 0,01% de  
15 sulfato ferroso, 0,01% de cloruro de potasio y 0,2% de fosfato de dihidrógeno y potasio, todo en peso.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que la fuente de carbono comprende también un miembro elegido del grupo que consiste en glucosa, dextrina,  
20 glicerina y harina de trigo, no excediendo la cantidad total de la fuente de carbono el citado 5% en peso, y en el que la fuente de nitrógeno comprende también un miembro elegido del grupo que consiste en harina cruda de so-  
25 ción de maiz, no excediendo la cantidad total de la fuente de nitrógeno el citado 3% en peso.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio sólido principal de cultivo o el me-  
dio sólido de cultivo para sembrar Koji está constituido  
30 por los siguientes componentes adecuados: salvado de trigo:

323766



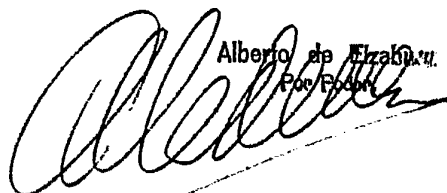
paja : agua en la proporción de 5 : 3 : 4 de contenido.

7.- Un procedimiento para la preparación de amilasa estable y activa en medio ácido.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que  
5 antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintisiete hojas es critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 10 DIC. 1957

  
Alberto de Elzaburu  
Por Encargo

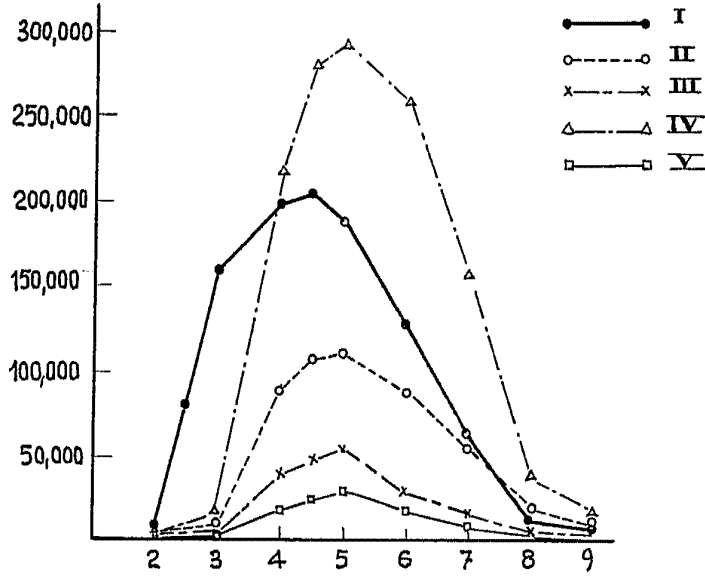


Fig: 1

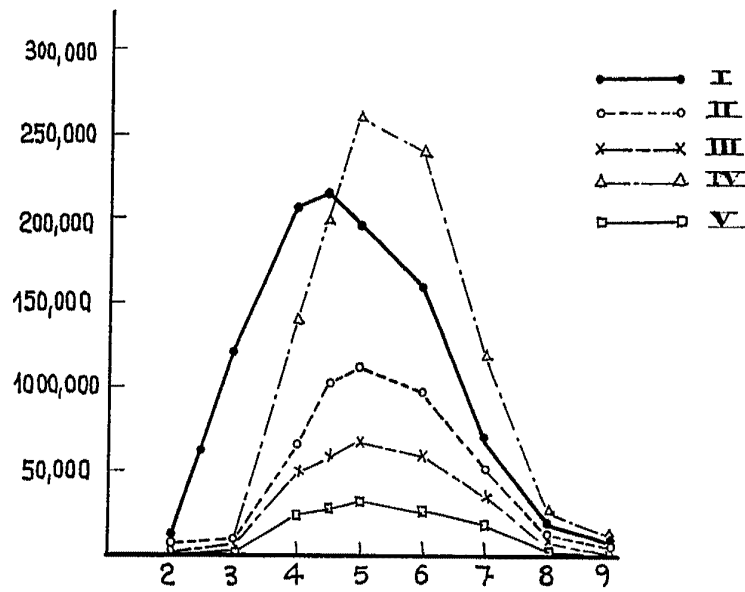


Fig: 2

ESCALA VARIABLE

Alberto de Echebur  
Director General

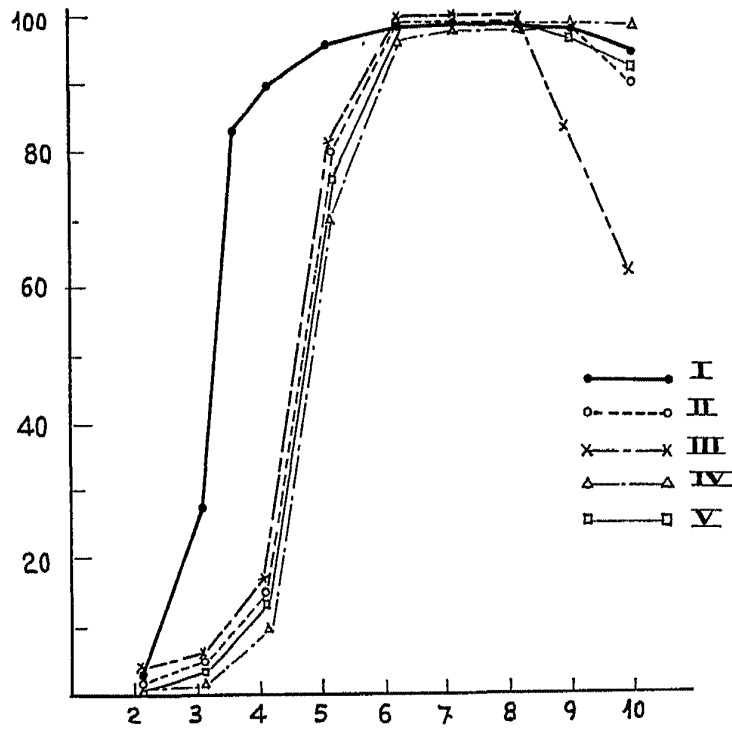


Fig:3

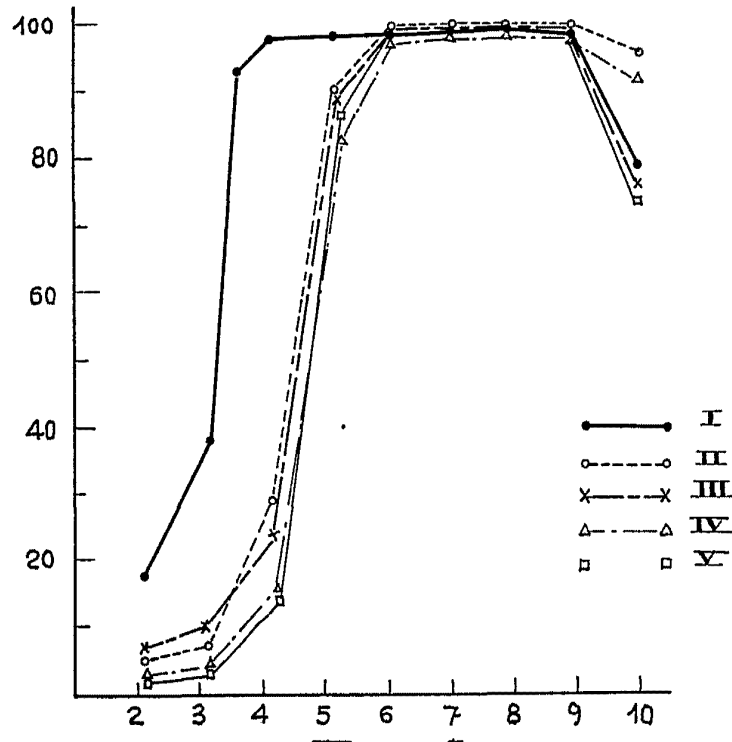


Fig:4

ESCALA VARIABLE

*Handwritten signature*  
Dai Nippon Pharmaceutical Co., Ltd.  
Tokyo, Japan



21 AB

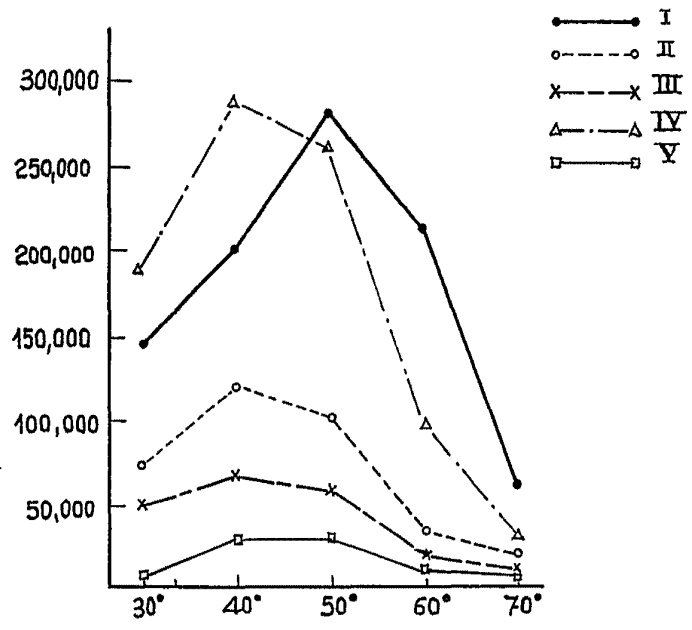


Fig: 5

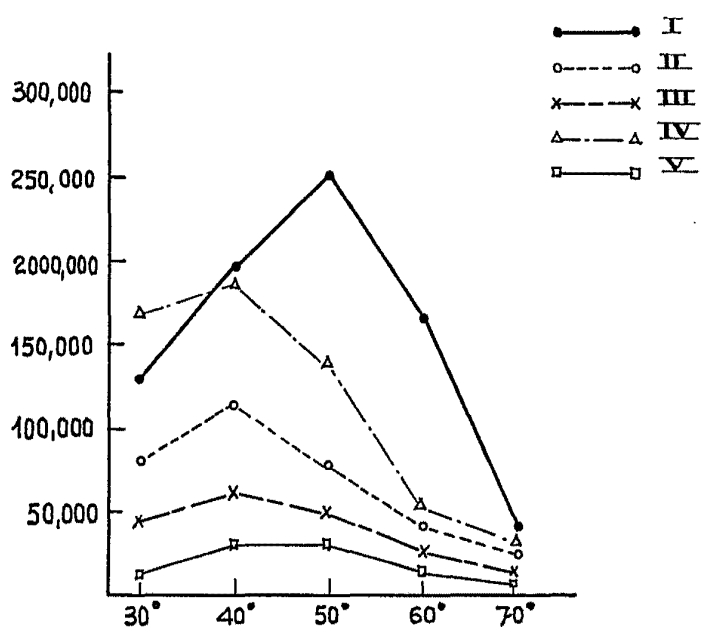


Fig: 6

ESCALA VARIABLE

*Handwritten signature*

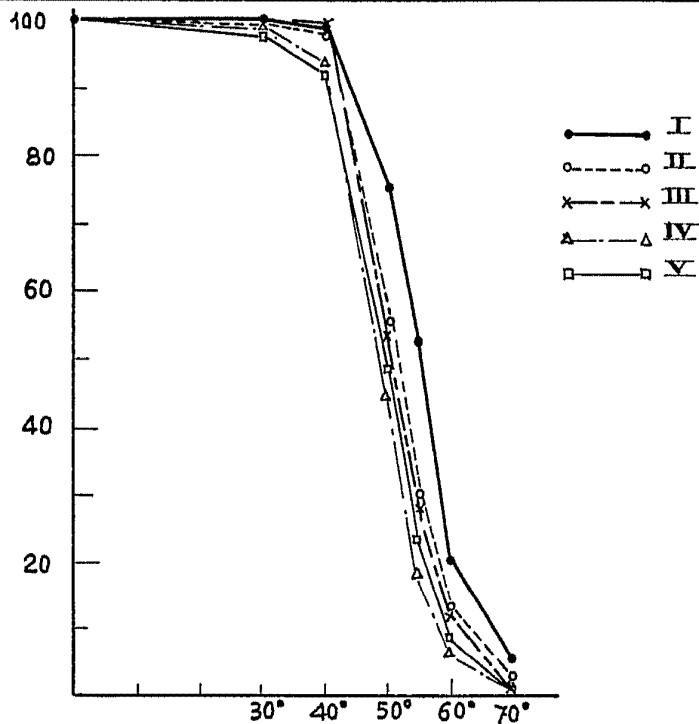


Fig: 7

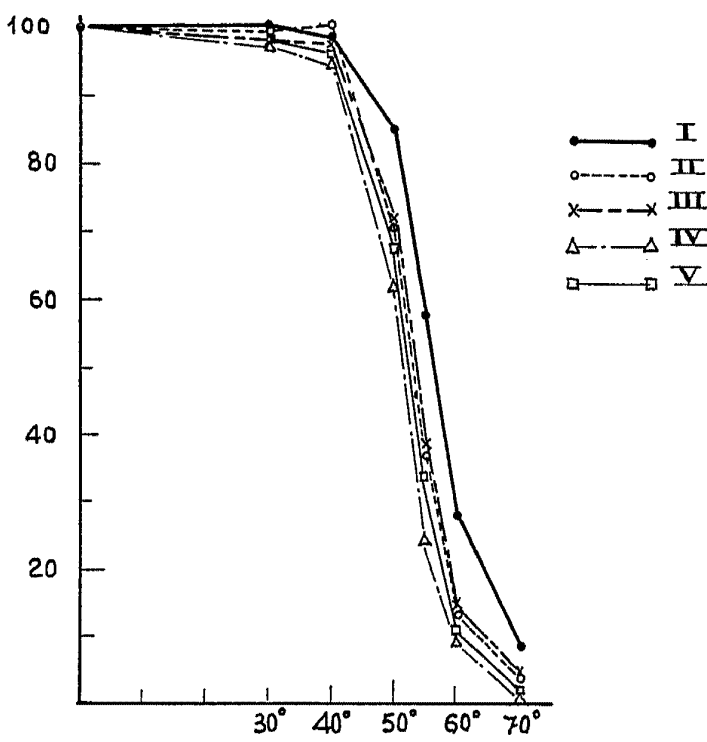


Fig: 8

ESCALA VARIABLE

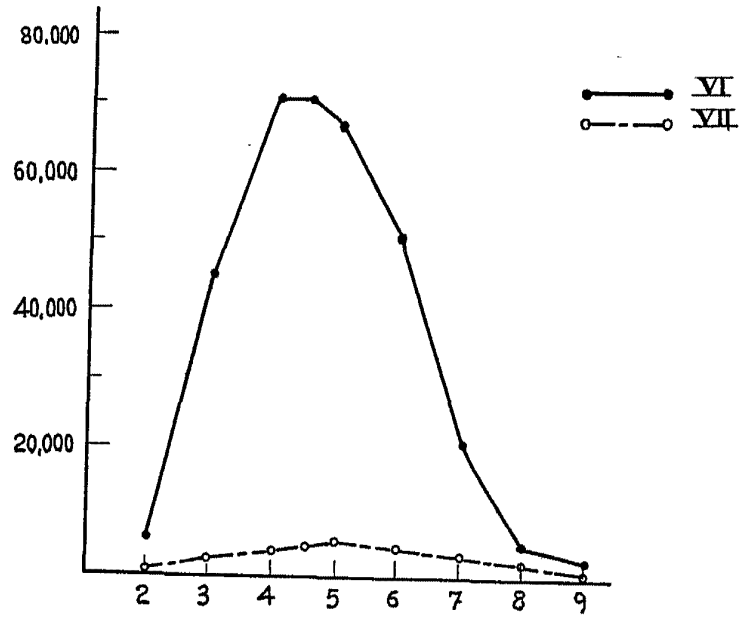


Fig: 9

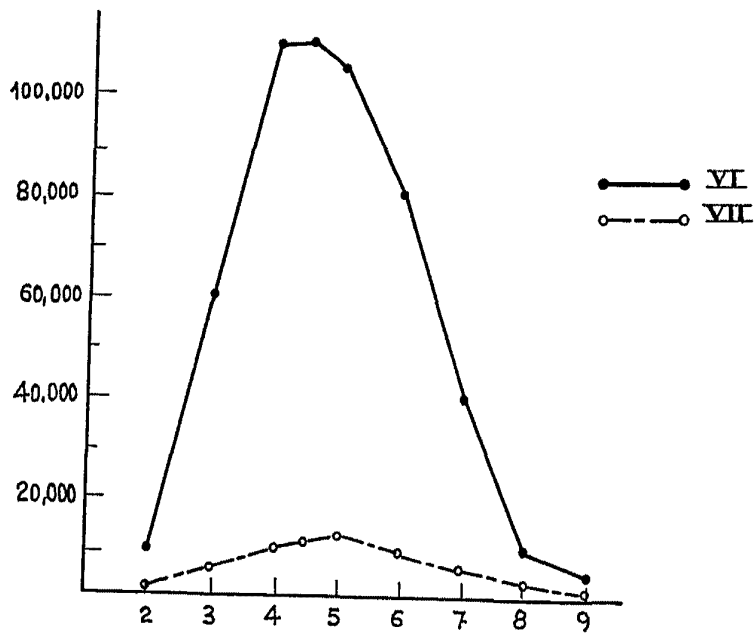


Fig: 10

ESCALA VARIABLE

? 1 AB

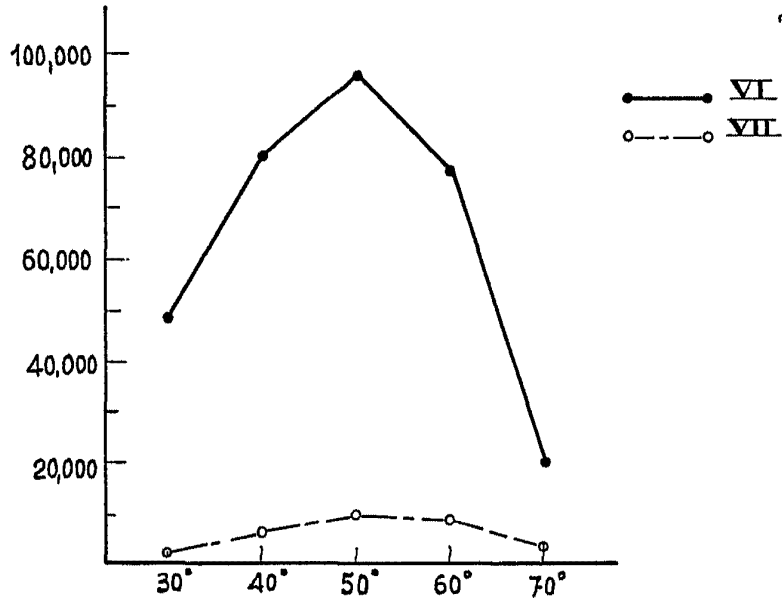


Fig: 11

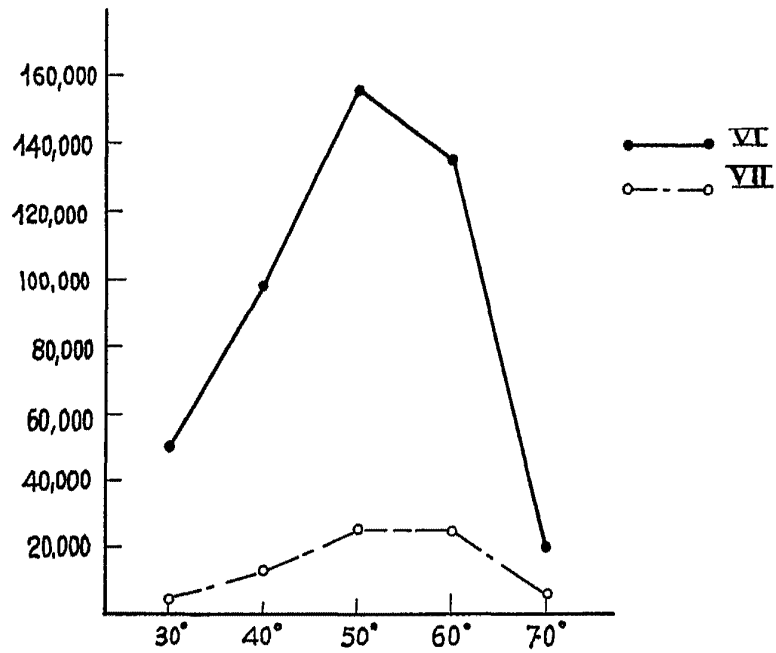


Fig: 12

ESCALA VARIABLE

*Handwritten signature*