



326151

P.- 31.675

U.S. Serial No 335.009

20 MAR 1966

326151

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC., entidad norteamericana, establecida en, Elkhart, Indiana, Condado de Elkhart, Estados Unidos de América, por:

" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE AMILOGLUCOSIDASA "

Este invento se refiere a un procedimiento para la purificación de amiloglucosidasa. Más particularmente, se refiere a la utilización de materiales cambiadores de iones catiónicos para separar la impureza de transglucosidasa de la amiloglucosidasa.

La amiloglucosidasa, una enzima que ha sido citada también como glucamilasa, enzima glucogénica, glucogenasa de almidón, gamma-amilasa y alfa-1,4-glucano-glucosidasa, es un material bien conocido que cataliza la hidrólisis del almidón, de las dextrinas o de la maltosa a dextrosa.

326 151

29A



Parece que esta enzima ayuda en la formación de dextrosa directamente desde el almidón sin la producción de productos intermedios, tales como azúcares superiores y dextrinas solubles. Esta enzima es también capaz de catalizar la hidrólisis de los productos intermedios de hidrólisis de almidón para obtener dextrosa.

Es conocido que la amiloglucosidasa es preparada por procedimientos de fermentación que emplean determinadas cepas de hongos que pertenecen al grupo de "Aspergillus niger" y determinadas cepas de la especie de "Rhizopus". Hongos ilustrativos son los de las especies "Aspergillus niger", "Aspergillus oryzae", "Rhizopus delemar", "Aspergillus phoenicis" y similares.

Se conoce también que las cepas de hongos que producen amiloglucosidasa producen también otras enzimas, tales como transglucosidasa. La transglucosidasa activa la formación, particularmente a partir de maltosa y glucosa, de carbohidratos no fermentables. Cuando la transglucosidasa está presente como un contaminante en la amiloglucosidasa empleada para hidrolizar el almidón a dextrosa, se obtienen rendimientos más bajos en dextrosa que si estuviese ausente la transglucosidasa. La presencia de transglucosidasa en las preparaciones usuales de amiloglucosidasa ha sido reconocida generalmente y se han desarrollado considerables trabajos para reducir y eliminar sustancialmente la impureza de transglucosidasa en la amiloglucosidasa.

Los métodos de la técnica anterior para separar transglucosidasa de amiloglucosidasa han empleado arcilla, silicato magnésico sintético, tierra de batán, y materiales cambiadores de iones aniónicos para adsorber selectivamente



la transglucosidasa. Generalmente, estos métodos implica-  
ban la adsorción de toda la amiloglucosidasa y la trans-  
glucosidasa con elución selectiva de la amiloglucosidasa  
en una forma purificada. Dichos métodos de "Adsorción-elu-  
5 ción" son complejos y no son completamente satisfactorios.  
Se ha empleado también la precipitación selectiva. Ninguno  
de los métodos de purificación de la técnica anterior se-  
paró todas las impurezas de transglucosidasa. También los  
métodos de purificación de la técnica anterior implicaban  
10 generalmente una pérdida de amiloglucosidasa.

Es un objeto del presente invento crear un proce-  
dimiento que separa todas las cantidades detectables de  
transglucosidasa de amiloglucosidasa.

Otro objeto de presente invento es crear un proce-  
15 dimiento simple para separar transglucosidasa de amiloglu-  
cosidasa.

Otro objeto más es crear un procedimiento para la  
purificación de amiloglucosidasa que hace minimas las pér-  
didas de amiloglucosidasa.

20 La figura 1 es una gráfica de densidad de un cromatograma  
electroforético obtenido a partir de una amiloglu-  
cosidasa de técnica anterior que contenía una impureza de  
transglucosidasa.

25 La figura 2 es una gráfica de densidad de un cromatograma  
electroforético obtenido a partir de amiloglucosi-  
dasa tratada por el procedimiento del presente invento.

De acuerdo con el presente invento, un material cam-  
biador de iones catiónico es puesto en contacto con una so-  
lución de amiloglucosidasa que contiene impurezas de trans-  
30 glucosidasa para adsorber selectivamente la impureza de

326151



transglucosidasa por el material cambiador catiónico sin adsorber ninguna cantidad apreciable de amiloglucosidasa. Esto se efectua convenientemente por el simple procedimiento de hacer circular una solución acuosa de amiloglucosidasa que contiene una impureza de transglucosidasa a través de un lecho de material cambiador de iones catiónico y retirar del lecho la solución de amiloglucosidasa así purificada. La transglucosidasa queda atras en el lecho. Alternativamente, se puede introducir material cambiador de iones catiónico en una solución de amiloglucosidasa, se puede dejar reposar hasta que la impureza de transglucosidasa es adsorbida y entonces el material catiónico que contiene la impureza de transglucosidasa puede ser separado, si se desea, de la amiloglucosidasa. Este procedimiento separa todas las cantidades detectables de impurezas de transglucosidasa de la amiloglucosidasa con pérdida mínima en amiloglucosidasa.

El procedimiento del presente invento es útil para purificar amiloglucosidasa en diversas formas. Puede estar en la forma de cultivos totalmente acuosos y de cervezas de fermentación conocidas en la técnica. Puede estar en la forma de material secado que es disuelto entonces en medios acuosos para su utilización en el presente procedimiento. La concentración de amiloglucosidasa en la solución acuosa no es critica. Tal como es conocido en la técnica, soluciones diluidas requeriran grandes cantidades de material líquido a tratar con el fin de purificar una cantidad dada de amiloglucosidasa. Las soluciones más concentradas posibilitaran purificar una cantidad dada de amiloglucosidasa con menos esfuerzo y en un periodo de



tiempo más corto.

Los materiales cambiadores de iones cationicos útiles en este nuevo procedimiento estan preferiblemente en una forma sólida. Son preferidas las formas sólidas, tales como resinas sólidas, ya que proporcionan una fase separada y son facilmente separadas de las soluciones de amiloglucosidasa purificadas. Estos materiales sólidos son utilizados en forma granular de tamaño conveniente de forma que no crean una resistencia sustancial a la circulación del fluido a través de un lecho relleno de los materiales. Dichas consideraciones son bien conocidas en la técnica. Los materiales cambiadores de iones cationicos son bien conocidos y estan disponibles comercialmente desde diversas fuentes. Materiales cambiadores de cationes ácidos característicos y su preparación estan descritos, por ejemplo, en las patentes USA 2.340.110; 2.366.007; y 2.681.320. Tales materiales pueden consistir por ejemplo, en estireno-divinilbenzeno polimerizado que contiene lugares o puntos reactivos cambiadores de iones. Pueden ser empleados también otros materiales tales como resinas de fenol-formaldenido, poliestireno y derivados de carbón que contienen los lugares reactivos apropiados. En los materiales cambiadores de cationes fuertemente ácidos los lugares reactivos son generalmente grupos de ácido sulfónico. En los materiales cambiadores de cationes de acidez intermedia los lugares reactivos son generalmente grupos de ácido fosforico. En los materiales cambiadores de cationes debilmente ácidos, los lugares reactivos son generalmente grupos de ácido carboxilico. Las sales de los anteriores grupos ácidos, tales como las sales de sodio y de potasio, pueden ser empleadas también como

# 326151



lugares reactivos en los materiales cambiadores de iones cationicos. Otros materiales cambiadores de iones cationicos útiles en el presente invento son la carboximetilcelulosa y el fosfato de celulosa descritos en la J. Am. Chem. Soc. 78, 751-755 (1.956).

Materiales cambiadores de cationes fuertemente ácidos útiles en el presente invento son vendidos bajo las siguientes marcas registradas ilustrativas por los suministradores indicados:

	<u>Grupo reactivo</u>	<u>Marca registrada</u>	<u>Suministrador</u>
10	Sulfonico	Dowex 50w-x-8	Dow Chemical co.
	Sulfonico	Amberlite 200	Rohm and Haas Co.
	Sulfonico	Amberlite IR - 120	Rohm and Haas Co.
	Sulfonico	Permutit Q	The Permutit Co.
15	Sulfonico	Zeo-Karb	The Permutit Co.
	Sulfonico	Nalcite HCR	National Aluminate Co.
	Sulfonico	Nalcite HGR	National Aluminate Co.
	Sulfonico	Nalcite HDR	National Aluminate Co.

Un material cambiador de cationes de acidez intermedia útil en el presente invento es vendido bajo la siguiente marca registrada ilustrativa por el suministrador indicado:

	<u>Grupo reactivo</u>	<u>Marca registrada</u>	<u>Suministrador</u>
	Fosforico	Duolite C-65	Chemical Process Co.

Resinas cambiadoras de cationes debilmente ácidas útiles en el presente invento son vendidas bajo las siguientes marcas registradas ilustrativas por los suministros indicados:



<u>Grupo reactivo</u>	<u>Marca registrada</u>	<u>Suministrador</u>
Carboxilico	Amberlite IRC-50	Rohm and Haas Co.
Carboxilico	Permutit H-70	The Permutit Co.

5                    Los materiales cambiadores de iones cationicos deberan ser purificados apropiadamente y puestos en la forma reactiva deseada antes de su utilización en el presente procedimiento. Los materiales que son suministrados en la forma de ácido libre son dejados reposar en contacto con

10                    agua destilada o desionizada a la temperatura ambiente durante varias horas con el fin de separar cualquier color u otro material lixiviable. Entonces el material es lavado varias veces con agua destilada, es filtrado y utilizado. Si se desea un valor de pH ácido particular para

15                    el material, el material es tratado con un ácido tal como ácido clorhidrico, y es lavado después con agua destilada hasta que se obtiene el pH deseado. Entonces es utilizado el material catiónico. Los materiales que son suministrados en la forma de sal, tales como la sal de sodio de ma-

20                    terial cambiador de iones de ácido sulfónico, son también lavados con agua destilada para separar el material de color u otro material lixiviable y son tratados entonces con álcalis, tales como hidróxido sódico, y lavados con agua hasta que se obtiene el pH deseado para los materia-

25                    les cationicos. Entonces estos son utilizados en el procedimiento del presente invento.

                    Según purifica el material cambiador de iones catiónico a la amiloglucosidasa, resulta cargado con la impureza de transglucosidasa y disminuye el número de

30                    lugares reactivos útiles. Entonces éste debe ser regene-



rado para nueva utilización. Las formas de ácido libre de materiales cambiadores de iones catiónicos son regeneradas generalmente tratandolas con un ácido tal como ácido clorhidrico y lavando entonces el material para separar la impureza de transglucosidasa. Entonces el material es ajustado al pH apropiado tal como se describe anteriormente y es nuevamente utilizado. Las formas de sal de materiales cambiadores de iones catiónicos son regeneradas generalmente tratandolas con un álcali tal como hidróxido sódico, y lavando entonces el material para separar impurezas. Entonces el material es ajustado al pH apropiado tal como se describe anteriormente y después es utilizado de nuevo. Cuando los cambiadores de iones cationicos son regenerados apropiadamente tal como es bien conocido en la tecnica, pueden ser utilizados de nuevo indefinidamente ya que no son consumidos durante el proceso de separar la impureza de transglucosidasa de amiloglucosidasa.

La capacidad de los materiales cambiadores de iones catiónicos para la separación de impureza de transglucosidasa de amiloglucosidasa variará para cada material particular. Esta capacidad puede ser determinada experimentalmente para cada material por métodos bien conocidos en la tecnica.

Las condiciones del procedimiento para llevar a cabo el presente invento no son estrechamente criticas o decisivas. Se pueden emplear temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 60°C. A temperaturas por debajo de aproximadamente 0°C las soluciones de amiloglucosidasa tenderan a congelarse. A temperatura por encima de aproximadamente 60°C la amiloglucosidasa resultará inactivada. Pre-



feriblemente, se emplean temperaturas desde aproximadamen-  
te 20°C hasta aproximadamente 30°C. El procedimiento se  
puede llevar también a cabo bajo valores de pH desde apro-  
ximadamente 3,5 hasta aproximadamente 9,5. Se emplea pre-  
feriblemente las condiciones de presión atmosférica pero  
se pueden utilizar si se desea presiones por encima y por  
debajo de la atmosférica, sin ventajas materiales. El tiem-  
po de contacto entre la solución de amiloglucosidasa y el  
material cambiador de iones catiónico es gobernado por el  
tiempo requerido para que la solución de amiloglucosidasa  
pase a través del lecho de material cambiador de iones ca-  
tiónico granulado. Dichos tiempo de reacción no son decisivos  
o críticos en este procedimiento.

El procedimiento del presente invento separa trans-  
glucosidasa de amiloglucosidasa con pérdidas mínimas de  
amiloglucosidasa. Se crean métodos para determinar el con-  
tenido en amiloglucosidasa (definido en término de unida-  
des de actividad por ml) del material de partida y del ma-  
terial purificado para medir la recuperación de amiloglu-  
cosidasa. La separación de transglucosidasa es determina-  
da incubando una solución de maltosa con la amiloglucosi-  
dasa purificada por el presente procedimiento y midiendo  
la actividad óptica (rotación específica) del producto re-  
sultante. Este valor de rotación específica es comparado  
entonces con el valor de rotación específica obtenido in-  
cubando una solución de maltosa con amiloglucosidasa que  
no ha sido purificada por el presente procedimiento. El  
valor de rotación específica obtenido con material puri-  
ficado será menor que el valor de rotación óptica obteni-  
do con el material no purificado. Cuanto mayor sea el valor

326151

29 AB



de rotación específica de cualquier muestra dada, tanto mayor será el contenido en transglucosidasa.

Estos métodos de determinación se describen seguidamente:

5            Actividad de amiloglucosidasa. Se prepara una solución acuosa que contiene 4,0 g de almidón soluble (base exenta de humedad) y 5,6 ml de tampón de acetato 1,1 M, pH 4,2, por 100 ml. Exactamente 50 ml de la solución de almidón tamponada son introducidos con pipeta en un frasco volumétrico  
10 de 100 ml y son equilibrados en un baño de agua a 60° C durante 10 minutos. Entonces se añade y mezcla 1,0 ml de solución de enzima, apropiadamente diluida de manera que aparecerá una hidrólisis del 20 a 30 % durante el periodo de incubación. Después de exactamente 60 minutos de incubación en el  
15 baño de agua a 60° C, la solución es ajustada a un punto final de fenoftaleína de color rosa añadiendo hidróxido sódico 2 N. La solución es enfriada entonces a la temperatura ambiente y es diluida en volumen con agua destilada. El azúcar reductor, calculado como dextrosa, es determinado sobre  
20 la muestra diluida y sobre una solución testigo tratada de la misma manera pero sin enzima añadida, por el método Scaorl o similares. La actividad de amiloglucosidasa es calculada a partir de la fórmula:

$$A = \frac{S - B}{E} \quad \text{en la que}$$

25

A = actividad de amiloglucosidasa, unidades por ml de preparación de enzima.

S = Azúcares reductores en la muestra tratada con enzima, gramos por 100 ml de muestra diluida.

30 D = Azúcares reductores en muestra testigo, g por 100 ml de



muestra diluida.

E = Cantidad de enzima utilizada, ml por 100 de muestra diluida.

Actividad de transglucosidasa.- Se prepara una solución de  
5 maltosa disolviendo 100,0 g de maltosa químicamente pura en  
agua destilada y diluyendo hasta 500 ml. Una porción de 50,0  
ml de esta solución de maltosa al 20 % en peso (% p/v) es  
colocada entonces en un frasco o matraz de 100 ml y es dilui-  
da hasta 100 ml con agua destilada. Al frasco se añaden 5 ml  
10 de tampón de acetato 1,0 M, pH 4,0. Después de mezclar, se  
añade una cantidad de preparación de enzima que contiene 5,0  
unidades de actividad de amiloglucosidasa. El frasco es colo-  
cado en un baño de agua a 60° C y es calentado durante 48 ho-  
ras. Al final de este periodo de incubación, se mide la rota-  
15 ción óptica de la solución de azúcar por técnicas bien cono-  
cidas. Cuanto mayor sea la rotación específica medida a 25°  
C  $\alpha_D^{25}$ , tanto mayor será la actividad de transglucosidasa  
o el contenido de la preparación de enzima que en ensayada.

El presente invento será descrito más aun en los  
20 siguientes ejemplos ilustrativos.

Ejemplo 1.- Una porción de 50 ml de material cambiador de  
iones catiónico Duolite C-65 en la forma de ácido fosforico  
libre fué colocada en un tubo de vidrio vertical de 2 cm.  
de diametro interior. El material catiónico estaba soportado  
25 de una manera convencional. El material cationico fué lava-  
do hasta un pH de 4,0. Una muestra de 930 ml de solución  
acuosa de amiloglucosidasa que contenia una impureza de  
transglucosidasa fue hecha pasar hacia abajo bajo la fuer-  
za de la gravedad a temperatura ambiente a través del lecho  
30 cambiador de iones relleno y fue recogida en 21 fracciones

326151

29 ABR



cada una de aproximadamente 45 ml. La solución de amilo-  
glucosidasa fue obtenida a partir de una fermentación de  
masa de maíz acuosa con una cepa de hongo del grupo "Asper-  
gillus niger". El filtrado de esta fermentación fue utili-  
5 zado. Análisis de partes alícuotas de las soluciones trata-  
das y no tratadas de amiloglucosidasa indicaron una recupe-  
ración de 91,34 % de la actividad de amiloglucosidasa en el  
producto purificado. La actividad de transglucosidasa fué  
medida sobre el material de partida no tratado y sobre cada  
10 una de las 21 fracciones de producto. La rotación especifi-  
ca del material de partida era de  $[\alpha]_D^{25} = 55,4$ . La rota-  
ción específica de las fracciones de producto era de 53,8.  
Esta reducción significativa en la rotación óptica del pro-  
ducto indica una separación sustancial de impureza de trans-  
15 glucosidasa.

Se indicó la purificación de otra manera. Muestras  
de soluciones purificadas y no tratadas de amiloglucosidasa  
fueron sometidas a electroforesis en papel a 250 voltios  
durante 2 horas a una corriente de 0,6 miliamperios/cm de  
20 ancho, en la presencia de tampón de veronal a un pH 9,6 y  
una concentración iónica de 0,1. Se hicieron entonces grafi-  
cas de densidad de los cromatogramas electroforéticos re-  
sultantes. La figura 1 muestra la gráfica de densidad obte-  
nida a partir del material de partida no tratado. La canti-  
25 dad relativa de proteína (enzima) presente en una posición  
dada es representada gráficamente en función de la posición  
a lo largo del cromatograma en papel. La posición "cero"  
mostrada sobre el eje de abscisas indica el punto de inser-  
ción de la mezcla sometida a electroforesis. La curva a la  
30 izquierda de la posición "cero" muestra el desplazamiento



o migración de los componentes de la mezcla bajo la influencia del campo eléctrico. La presencia de transglucosidasa está indicada por la altura de la curva en la posición 10. La amiloglucosidasa está indicada en la posición 12. La figura 2 muestra la gráfica de densidad obtenida a partir del material purificado. No hay transglucosidasa detectable y la porción de amiloglucosidasa de la curva es sustancialmente idéntica a la de la figura 1 indicando un cambio mínimo en la actividad de amiloglucosidasa.

5  
10 Ejemplo 2.- Una porción de 500 ml de material cambiador de iones catiónico Amberlite 200 en la forma de ácido sulfónico libre fue colocada en un tubo de vidrio vertical de 4 cm. de diámetro interior. El material catiónico fue lavado hasta un pH de 4,5. Una porción de 3.000 ml de solución acuosa de amiloglucosidasa preparada como en el ejemplo 1 fué hecha pasar  
15 hacia abajo a través del lecho cambiador de iones relleno y fué recogida en fracciones de 250 ml. La recuperación de amiloglucosidasa era del 93,8 %. La actividad de transglucosidasa en el material de partida fué indicada por una rotación óptica de 55,5. La rotación óptica media de las fracciones 1 - 12 recogidas fué de 54,6 lo cual indicó una separación significativa de transglucosidasa por tratamiento de  
20 cambio de iones. El material catiónico resultó completamente cargado después que se recogió la fracción número 12 y las fracciones subsiguientes tenían igual actividad de transglucosidasa que el material de partida. El líquido de las fracciones 1 a 12 (3.000 ml) fué evaporado y concentrado hasta 600 ml. El concentrado contenía 25,0 unidades de amiloglucosidasa por ml para una recuperación total durante la concentración de 97,2 %. La rotación específica del concentrado  
25  
30

326 15 1

29 AB



era de 54,2 indicando que incluso en una forma concentra-  
da la actividad de transglucosidasa está sustancialmente  
por debajo de la de la solución de enzima original antes  
del tratamiento de cambio de iones.

5 Ejemplo 3. Una porción de 500 ml de material cambiador  
de iones catiónico Amberlite IRC 50 en la forma de ácido  
carboxílico libre fue colocada en un tubo de vidrio verti-  
cal de 4 cm de diámetro interior y fue lavada hasta un pH  
de 4,3. Una porción de 6.500 ml de solución acuosa de ami-  
10 loglucosidasa preparada como en el Ejemplo 1 fue hecha pa-  
sar hacia abajo a través del lecho relleno y fue recogida en  
fracciones de 250 ml. La recuperación de amiloglucosidasa  
fue de 100%. La rotación óptica del material de partida fue  
de 56,5 mientras que la rotación óptica media de fraccio-  
15 nes de producto fue de 54,5 indicando una separación sus-  
tancial de transglucosidasa. Una porción de 4.200 ml del  
producto purificado fue evaporada hasta 700 ml. El concen-  
trado tenía una rotación óptica de 54,5 que está muy por  
debajo de la solución de enzima original antes del trata-  
20 miento de intercambio de iones. Hubo una recuperación de  
100% de la amiloglucosidasa durante esta concentración.

Ejemplo 4. Una porción de 100 ml de material cambiador  
de iones catiónicos Amberlite 200 en la forma de ácido sul-  
fónico libre fue colocada en un tubo de vidrio vertical de  
25 2 cm de diámetro interior y fue lavada hasta un pH de 5,0.  
Una porción de 500 ml de solución acuosa de amiloglucosi-  
dasa preparada como en el ejemplo 1 fue hecha pasar hacia  
abajo a través del lecho relleno y fue recogida en fraccio-  
nes de 14 ml. La recuperación de amiloglucosidasa fue del  
30 93,5%. La rotación óptica del material de partida fue de



55,1 mientras que la rotación óptica media de fracciones de producto fue de 53,5, indicando una separación sustancial de transglucosidasa.

5 Ejemplo 5. Una porción de 100 ml de material cambiador de iones catiónico Amberlite I.R.C. 50 en la forma de sal sódica fue colocada en un tubo de vidrio vertical de 2 cm de diámetro interior y fue lavada hasta un pH de 7,5. Una porción de 600 ml de solución acuosa de amiloglucosidasa preparada como en el ejemplo 1 fue hecha pasar hacia abajo a través del lecho relleno y fue recogida en fracciones de 20 ml. La recuperación de amiloglucosidasa fue de 92,3%. La rotación óptica del material de partida fué de 55,4 mientras que la rotación óptica media de las fracciones 1 a 20 inclusive era de 54,2, indicando una separación sustancial de transglucosidasa.

10

15

Ejemplo 6. Una porción de 100 ml de material cambiador de iones catiónico Amberlite 200 en la forma de sal sódica fue colocada en un tubo de vidrio vertical de 2 cm de diámetro interior y fue lavada hasta un pH de 9,5. Una porción de 500 ml de solución acuosa de amiloglucosidasa preparada como en el ejemplo 1 fue hecha pasar hacia abajo a través del lecho relleno y fue recogida en 35 fracciones de 14 ml. La recuperación de amiloglucosidasa fue de aproximadamente 92%. La rotación óptica del material de partida fue de 55,4 mientras que la rotación óptica media de las fracciones 1 a 10 inclusive del producto era de 54,4, indicando una separación sustancial de transglucosidasa. El material cambiador de iones resultó saturado con transglucosidasa después de la recogida de la fracción 10. La rotación óptica (media) de las fracciones 11 a 35 inclusive era de 55,3. lo mismo

20

25

30

326151

29 AB



que el material de partida, indicando que no hubo separación de transglucosidasa de estas fracciones.

Ejemplo 7. Una porción de 50 ml de material cambiador de iones catiónico Duolite C-65 en la forma de sal sódica fue colocada en un tubo de vidrio vertical de 2 cm de diámetro interior y fue lavada a un pH de 7,5. Una porción de 869 ml de solución acuosa de amiloglucosidasa preparada como en el ejemplo 1 fue hecha pasar hacia abajo a través del lecho relleno y fue recogida en fracciones de 45 ml. La recuperación de amiloglucosidasa fue de 95,0%. La rotación óptica del material original fue de 55,8, mientras que la rotación óptica media de las fracciones del producto fue de 54,35, indicando una separación sustancial de transglucosidasa.

La técnica anterior ha sugerido la utilización de materiales cambiadores de iones aniónicos para la separación de impurezas de transglucosidasa desde amiloglucosidasa. El siguiente ejemplo describe la utilización de dicho material cambiador de iones aniónico.

Ejemplo 8 . Una porción de 100 ml de material cambiador de iones aniónico Duolite A-2 (vendido por Chemical Process Company y que contiene un grupo reactivo de fosfato) fue colocada en un tubo de vidrio vertical de 2 cm de diámetro interior y fue lavada hasta un pH de 6,3. Una porción de 485 ml de solución acuosa de amiloglucosidasa preparada como en el ejemplo 1 fue hecha pasar hacia abajo a través del lecho relleno y fue recogida en fracciones de 50 ml. La columna fue lavada con agua destilada para formar un volumen total de efluente de 550 ml. La recuperación de amiloglucosidasa fue de 92%. La rotación óptica del material original fue de 55,3 mientras que la rotación óptica de las fracciones era como media de



55,2. Así, no hubo separación de transglucosidasa por un material cambiador de iones aniónico empleado de esta manera.

En resumen, el presente invento se refiere a la utilización de un material cambiador de iones catiónico para separar selectivamente toda la impureza de transglucosidasa desde una solución de amiloglucosidasa sin pérdida o adsorción apreciable de amiloglucosidasa. Como tal, está es una ventaja clara sobre la técnica anterior. La purificación es más completa, la pérdida en amiloglucosidasa es menor y el procedimiento es más conveniente, ya que se elimina la elución selectiva para la recuperación de amiloglucosidasa.

15

## 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:

1ª.- Un procedimiento para la purificación de amiloglucosidasa que comprende poner en contacto un material cambiador de iones catiónico con una solución de amiloglucosidasa que contiene una impureza de transglucosidasa para adsorber selectivamente la impureza de transglucosidasa por el material cambiador de iones catiónico sin adsorber ninguna cantidad apreciable de amiloglucosidasa.

2ª.- Un procedimiento para la purificación de amiloglucosidasa que comprende hacer pasar una solución acuosa de amiloglucosidasa que contiene una impureza de transglucosidasa a través de un lecho de material cambiador de iones

326 15 1

29 AB



cationico con lo que la impureza de transglucosidasa es separada selectivamente de la solución por el material cambiador de iones cationico con una separación minima de amiloglucosidasa, y separar después la solución acuosa así purificada de amiloglucosidasa desde el material cambiador de iones cationico que contiene la impureza de transglucosidasa.

3<sup>a</sup>.- Un procedimiento según la reivindicación 2 en que el material cambiador de iones cationico está en la forma de ácido libre.

4<sup>a</sup>.- Un procedimiento según la reivindicación 2 en que el material cambiador de iones cationico está en la forma de sal.

5<sup>a</sup>.- Un procedimiento para la purificación de amiloglucosidasa que comprende poner en contacto un material cambiador de iones cationico con una solución de amiloglucosidasa que contiene una impureza de transglucosidasa para separar selectivamente la impureza de transglucosidasa con separación minima de amiloglucosidasa, separar la solución así purificada de amiloglucosidasa del material cambiador de iones cationico, repetir las anteriores operaciones hasta que el material cambiador de iones cationico resulta sustancialmente saturado con impureza de transglucosidasa, regenerar el material cambiador de iones cationico para separar la impureza de transglucosidasa desde dicho material, y volver a utilizar entonces el material cambiador de iones cationico para nueva purificación de soluciones de amiloglucosidasa.

6<sup>a</sup>.- Un procedimiento para la purificación de amiloglucosidasa que comprende hacer pasar una solución acuosa



de amiloglucosidasa que contiene una impureza de transglucosidasa a través de un lecho de material cambiador de iones cationico con lo que la impureza de transglucosidasa es separada selectivamente de la solución por el material cambiador de iones cationico con separación mínima de amiloglucosidasa, separar la solución acuosa así purificada de amiloglucosidasa desde el material cambiador de iones cationico que contiene la impureza de transglucosidasa, regenerar el material cambiador de iones cationico para separar la impureza de transglucosidasa desde dicho material, y utilizar entonces de nuevo el material cambiador de iones cationico para nueva purificación de soluciones acuosas de amiloglucosidasa.

7R.- Un procedimiento para la purificación de amiloglucosidasa.

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

Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 29 ABR. 1966

P. A.

Alberto de Elzabun  
Por Poder

mtr/.

Mey



326151

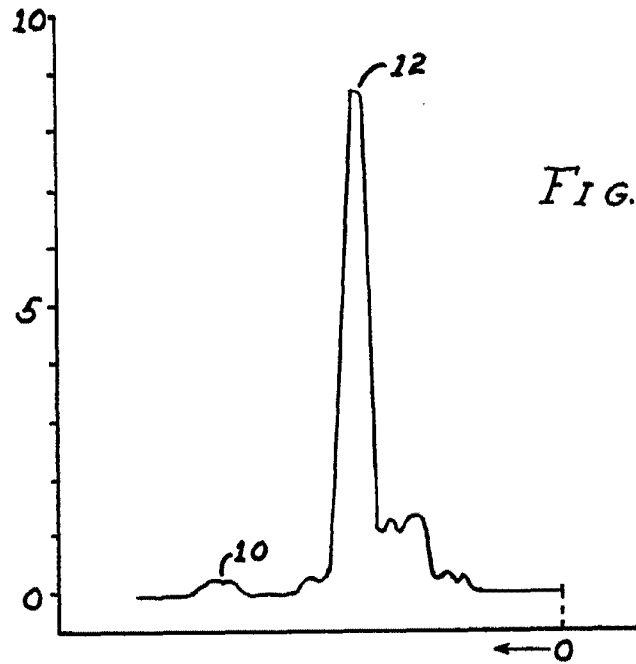


FIG. 1

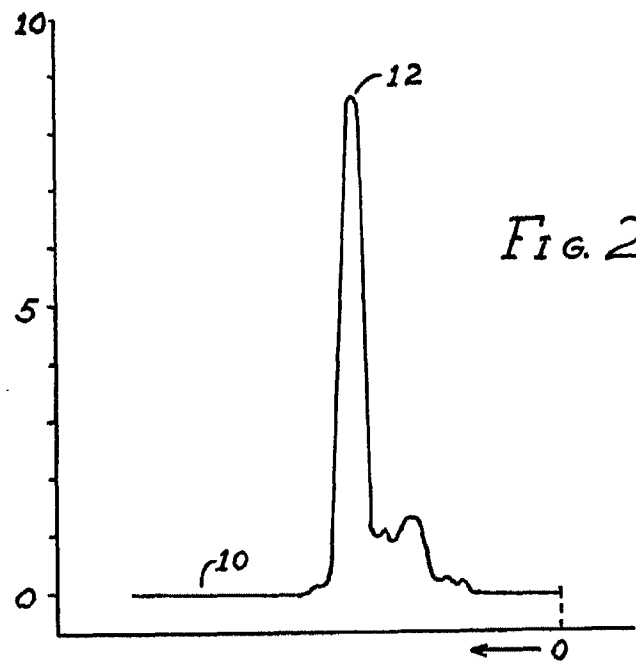


FIG. 2

Alberto de Lizaola  
Por Poder.