

27



412096

PATENTE DE INVENCION

Le A 14 201-Sp.

F.C. 10-4-75

Int. Cl.: C12K

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN INHIBIDOR  
DE AMILASA.

*Solicitante:* BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente  
en Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

Constituye el objeto de solicitudes anteriores de patente (solicitud de patente alemana P 20 64 092.0, solicitud de patente británica No. 59 939/71) el conocimiento de que una serie de actinomicas forman inhibidores de hidrolasas de glucósidos

5.

412096



5.

y, es decir, particularmente inhibidores de hidrolasas de glucósidos, preferiblemente de enzimas desdobladoras de hidratos de carbono del aparato digestivo. Un grupo de estos inhibidores es relativamente estable al calor y a la temperatura ambiente es resistente a ácidos y álcalis. Estos inhibidores pertenecen químicamente a la clase de los oligo- ó polisacáridos, respectivamente a sus derivados.

10.

En las citadas solicitudes de patente, por ejemplo en los Ejemplos 28 a 38 de la solicitud de patente alemana, se describe la obtención de tal inhibidor de amilasa a partir de la cepa de actinoplanáceas SE 50 perteneciente al orden de actinomicetales. Las soluciones de cultivo de fermentaciones óptimas de esta cepa contienen aproximadamente 30.000 a 40.000 UIA/ml, los inhibidores más puros obtenidos de las mismas tienen actividades específicas de 3 a 8 x 10<sup>6</sup> de unidades de inhibidor de amilasa UIA/g.

15.

20.

Constituye ahora el objeto de la invención un procedimiento para la producción de un inhibidor de amilasa, mediante el cual se obtienen rendimientos substancialmente más elevados y productos más puros que según el procedimiento de las citadas solicitudes de patente.

25.

Pues, se ha encontrado que, con la aplicación de una variante de la cepa SE 50, concretamente de la cepa SE 50/13 y con el empleo de soluciones de cultivo con un elevado contenido de almidón, se obtienen caldos de cultivo con contenidos de 100.000 a 110.000 UIA/ml.

30.

La variante SE 50/13 según el invento es obtenido si los cultivos de la cepa SE 50 se extienden a pinceladas sobre placas de cultivo de agar-agar o se distri-



5. buyen de otra manera sobre el medio de cultivo y, después de una incubación durante varios días a, por ejemplo 28° C, se separan por desinoculación las colonias desarrolladas y se las examinan en cuanto a su capacidad de producir el inhibidor de amilasa. Puede aumentarse el rendimiento de variantes en forma conocida, si el cultivo antes de la distribución sobre el medio de cultivo, se expone a mutágenos.
10. Además, se ha constatado que se puede adsorber el principio inhibidor a valores neutros de pH neutros (5 a 8) directamente desde la solución de cultivo sobre carbón activo y que se lo puede volver a desadsorber con alcoholes acuosos o acetona, particularmente a valores ácidos de pH (1 a 3). En vista de que a valores
15. ácidos de pH (1 a 3) sorprendentemente ocurre tan solo a un grado de indicio la adsorción del principio inhibidor, mientras que, por otra parte, una adsorción muy fuerte de los colorantes de impureza de los caldos de cultivo se produce sobre el carbón, con tal adsorción previa de las
20. soluciones de cultivo a valores ácidos de pH, pueden obtenerse inhibidores más puros con una actividad específica más elevada. [La Figura 1 muestra la adsorción del principio inhibidor de amilasa y de los colorantes pardos (medida como extinción a 440 nm) desde la solución de cultivo a valores pH ácidos, respectivamente neutros].
25. Las variantes obtenidas como arriba se ha indicado, no deben formar necesariamente en todas las soluciones de cultivo más inhibidor de amilasa que la cepa parental. Sin embargo, se ha constatado que se forman rendimientos particularmente elevados de inhibidor de amilasa
- 30.



si se introduce un 3 % o más de almidón, como fuente de carbono, en la solución de cultivo. Rendimientos particularmente elevados son obtenidos con un contenido de almidón de 4 a 6 %.

5. Si se cultiva durante 3 días a 28° C, por ejemplo en una solución de cultivo que, además de 2 % de almidón, contiene todavía 1 % de glucosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1 % de extracto de levadura y 0,4 % de CaCO<sub>3</sub>, se obtienen con la cepa SE 50 soluciones de cultivo que contienen 30 a 40.000 UIA/ml, y con la cepa SE 50/13 10. soluciones de cultivo que contienen 50 a 60.000 UIA/ml.

15. En una solución de cultivo de la composición de 5 % de almidón, 1 % de extracto de levadura, 0,2 % de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, después de la fermentación durante 3 días, por otra parte, se obtienen con la cepa SE 50 50 a 60.000 UIA/ml y con la cepa SE 50/13 100 a 130.000 UIA/ml.

20. El rendimiento en inhibidor de amilasa depende del contenido de almidón. Hasta aproximadamente 5,6 a 6 % de almidón en la solución de cultivo, el contenido de inhibidor de amilasa sube. A concentraciones más altas, las soluciones de cultivo llegan a ser tan viscosas que otras influencias, tales como por ejemplo el mal suministro de O<sub>2</sub> durante la fermentación reducen el rendimiento.

25. Los demás componentes de la solución de cultivo pueden variar considerablemente. En lugar de las fuentes de nitrógeno, hidrolizado de caseína + extracto de levadura, puede emplearse tan solo la cantidad correspondiente de extracto de levadura o de hidrolizado de caseína o bien pueden reemplazarse ambos por otras fuentes de nitrógeno, tales como por ejemplo peptona.
- 30.



5. También el sistema tampón consistente en el ajuste inicial, el  $\text{CaCO}_3$  y el fosfato de potasio, puede estar compuesto diferentemente. Tan solo ha de garantizarse que durante la fermentación se mantenga el valor pH dentro de límites fisiológicos, vale decir, entre 5,0 y 8,5, preferiblemente entre 6,0 y 7,8. Esto puede conseguirse por adición automática de ácidos y lejías, respectivamente.

10. Otros azúcares, tales como glucosa, pueden ser agregados a pequeñas concentraciones que aceleran la fermentación, particularmente el crecimiento.

La cepa SE 50 está depositada en el Central-bureau voor Schimmelcultures, en Baarn/Holanda, bajo el No. CBS 961.70 y la cepa SE 50/13 bajo el No. CBS 614.71.

15. Ensayo de amilasa.

Una unidad de inhibidor de amilasa (1 UIA) se define como aquella cantidad de inhibidor que inhibe dos unidades de amilasa al 50 %. Una unidad de amilasa (UA) es aquella cantidad de enzima que en un minuto bajo las condiciones de ensayo abajo indicadas desdoble 1  $\mu$  equivalente de ligaduras glucosídicas en el almidón. Los  $\mu$  equivalentes ( $\mu$  Val) de ligaduras desdobladas son determinados, como  $\mu$  Val de azúcares reductores formados, colorimétricamente con ácido dinitrosalicílico e indicados, mediante una curva de graduación de maltosa, como  $\mu$  Val equivalentes de maltosa. Para la realización del ensayo, se mezcla 0,1 ml de solución de amilasa (20 a 22 UA/ml) con 0 a 10  $\mu\text{g}$  de inhibidor ó 0 a 20  $\mu\text{l}$  de la solución a ensayar en 0,4 ml de amortiguador glicerofosfato de sodio 0,02-molar /  $\text{CaCl}_2$  0.001-molar, pH=6,9, y se equilibra du-

20.

25.

30.



5. rante aproximadamente 10 a 20 minutos en un baño de agua de 35° C. Entonces se hace la incubación durante 5 minutos con 0,5 ml de una solución al 1 % de almidón precalentada a 35° C (almidón soluble de la casa Merk, Darmstadt, No. 1252) y subsiguientemente se mezcla con 1 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (según P. Berufeld en Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol, Tomo 1, Página 149). Para el desarrollo del color, se calienta la preparación durante 5 minutos sobre el baño de María, entonces se la enfría y se la mezcla con 10 ml de agua destilada. La extinción a 540 nm es medida con relación a un valor en vacío correspondientemente fijado sin amilasa. Para la evaluación, se lee de una curva de graduación de amilasa previamente tomada la actividad de amilasa todavía eficaz después de la adición de inhibidor y de ella se calcula la inhibición porcentual de la amilasa aplicada. La inhibición porcentual es representada gráficamente como función del cociente.

20. 
$$\frac{\mu\text{g inhibidor} +}{\text{UA} ++}$$

- + calculado sobre sustancia seca,  
++ UA en la preparación no inhibida de la misma serie, obteniéndose el punto de inhibición del 50 % de la curva y transformando por cálculo en UIA/mg de inhibidor. Para la producción de tales inhibidores altamente activos, se hace fermentar la cepa SE 50/13 en una solución de cultivo de 5 % de almidón, 1 % de extracto de levadura y 0,2 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  durante 3 días a 28° C en matraces agitadores o en fermentadores de diferente tamaño. Una vez terminada la fermentación, para el descoloramiento, toda la prepa-
25.  
30.





- ma fuerte y duradera en diabeticos. En adiposos, la hiperglucemia alimenticia a menudo provoca una secreción de insulina particularmente fuerte que a su vez conduce a una deposición aumentada de grasa y a una reducida descomposición de grasa. A continuación o en conexión con tal hiperglucemia, en el caso de personas de metabolismo sano y adiposas, a causa del hiperinsulinismo o de la hiperinsulinemia, a menudo ocurre una hipoglucemia. Es conocido que tanto la hipoglucemia, como también la papilla de alimentos que demora en el estómago, aumentan la producción de jugo gástrico, que, por un lado, provoca la formación de una gastritis o de una úlcera del duodeno o del ventrículo o bien la favorece.

- Ahora se ha observado que el inhibidor de amilasa obtenido, aislado y purificado según los métodos de la invención arriba indicados, disminuye considerablemente la hiperglucemia e hiperinsulinemia alimenticia después de la administración de almidón cocido o no cocido a ratas y seres humanos. Por ésto, el inhibidor obtenido según la invención es apropiado como producto terapéutico para las siguientes indicaciones:

- Adipositas, hiperlipemia (aterosclerosis), diabetes, pre-diabetes, Ulcus ventriculi et duodeni.

- Dosificación: 1000 a 100.000 UIA/Kg una o varias veces por día antes y/o durante y/o después de las comidas, administradas por vía bucal.

- Formas de preparación: Pastillas, grageas, cápsulas, solución, suspensión granulado, goma de mascar y aditivo a alimentos y/o productos alimenticios deleitosos que contienen almidón.

412096



Ejemplo 1.

5. Se inocula un matraz de Erlenmeyer de una capacidad de 1 litro que contiene 120 ml de una solución de cultivo de la composición: 2 % de almidón, 1 % de glucosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,0 % de extracto de levadura, 0,4 % de  $\text{CaCO}_3$  (esterilización: 30 minutos a  $121^\circ \text{C}$ , pH antes de la esterilización ajustado a 7,2 con KOH) con 1 ml de un cultivo previo de la cepa SE 50/13 (obtenido en una solución de cultivo de la composición:
10. 3 % de glicerina, 3 % de harina de soya, 0,2 % de  $\text{CaCO}_3$ ; esterilización: 30 minutos a  $121^\circ \text{C}$ , pH después de la esterilización de 7,2), y se hace la incubación sobre una agitadora cilíndrica a  $28^\circ \text{C}$ ; después de una fermentación durante 3 días se obtiene un caldo de cultivo que contiene
15. 55.000 UIA/ml.

Ejemplo 2.

20. Se trabaja según el Ejemplo 1, pero con una solución de cultivo de la composición: 5 % de almidón, 1,0 % de extracto de levadura, 0,2 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; se obtiene un caldo de cultivo que contiene 108.000 UIA/ml.

Ejemplo 3.

25. Se inocula una solución de cultivo de la composición: 4 % de almidón, 0,7 % de extracto de levadura, según el Ejemplo 1, con la cepa SE 50/13; después de la fermentación durante 3 días, se obtiene un caldo de cultivo con 80.000 UIA/ml.

Ejemplo 4.

30. Se inocula una solución de cultivo de la composición: 5 % de almidón, 1,0 % de extracto de levadura, 0,4 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , según el Ejemplo 1, con la cepa SE 50/13;



después de la fermentación durante 4 días se obtiene un caldo de cultivo con 105.000 UIA/ml.

Ejemplo 5.

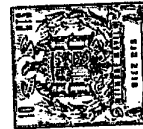
5. Se inocula una solución de cultivo de la composición: 6 % de almidón, 1,3 % de extracto de levadura, 0,2 de  $K_2HPO_4$ , según el Ejemplo 1, con la cepa SE 50/13; después de la fermentación durante 4 días, se obtiene un caldo de cultivo con 120.000 UIA/ml.

Ejemplo 6.

10. Se inocula un fermentador de vidrio que contiene 8 litros de la solución de cultivo según el Ejemplo 2, con el contenido de cultivo de 3 días en un matraz agitador, y se somete la solución de cultivo a la incubación bajo intensiva agitación y aireación durante 3 días a 28° C; se obtiene un caldo de cultivo que contiene 105.000 UIA/ml.

Ejemplo 7.

20. Se ajustan 6 litros de caldo de fermentación ( $105 \times 10^6$  UIA/litro), actividad total ( $630 \times 10^6$  UIA) según el Ejemplo 6, después de su enfriamiento hasta 20° C, con  $HNO_3$  semiconcentrado a un valor pH de 2,5 y se mezclan con 30 g. de carborafina-carbón activo y se agitan durante 10 minutos. Subsiguientemente se centrifuga durante 15 minutos a 10.000 r.p.m. y se concentra la capa superior clara de color amarillo claro (5,1 litros,  $100 \times 10^6$  UIA/litro, actividad total  $510 \times 10^6$  UIA), después de la neutralización con  $NH_3$  hasta 500 ml ( $970 \times 10^6$  UIA/litro, actividad total  $485 \times 10^6$  UIA). Se agitaron los 500 ml de concentrado durante 45 minutos con 200 g. de Amberlite IRA 410  $Cl^-$ , recogidos por filtración a succión y
- 25.
- 30.



- mezclaron con cuatro quintas partes en volumen = 400 ml de metanol, a fin de precipitar la cantidad principal de los productos de descomposición de almidón de elevado peso molecular (conjuntamente con restos de carbón activo todavía presentes). Se centrifuga durante 5 minutos a 5000 r.p.m. Se instilan los 850 ml de capa superior (450 x 10<sup>6</sup> UIA/litro, actividad total 380 x 10<sup>6</sup> UIA) bajo agitación intensiva en 4 litros de alcohol seco. Se recoge el precipitado coposo blanco por filtración a succión, se lava 3 veces con alcohol seco y 2 veces con éter y se seca en vacío a 50° C.
5. Rendimiento: 36 g. de un polvo blanco con 10 x 10<sup>6</sup> UIA/g. (actividad total 360 x 10<sup>6</sup> UIA) = un 57 % de rendimiento (calculado sobre la actividad).
10. Ejemplo 8.
15. Se ajustan 2 litros de caldo de fermentación (100 x 10<sup>6</sup> UIA/litro, actividad total 200 x 10<sup>6</sup> UIA) con HNO<sub>3</sub> semiconcentrado a un valor pH de 2,5 y se mezclan con 10 g. de carborafina-carbón activo (carborafina = negro descolorante hecho de turba). Se produce la sedimentación del micelio y de carbón después de una agitación durante 10 minutos a 15.000 r.p.m. dentro de 20 minutos. Se mezcla la capa superior clara (1,6 litros, 95 x 10<sup>6</sup> UIA/litro, actividad total 152 x 10<sup>6</sup> UIA), después de la neutralización con amoníaco, con 120 g. de carbón activo y se agita durante una hora. Subsiguientemente se agregan 60 g. de "Clarcell" como agente auxiliar de filtración y se recoge por filtración a succión. Se lava el residuo de carbón con 500 ml de agua y con 500 ml de etanol al 10 % y subsiguientemente se mezcla 2 veces, cada
- 20.
- 25.
- 30.



5. vez con 500 ml de acetona al 35 %, que se ajustó previamente con HCl a un valor pH de 2,5, y se agitó durante 20 minutos. Después de la agitación, se recoge por filtración a succión y se reúnen los filtrados (900 ml, 120 x 10<sup>6</sup> UIA/litro, actividad total 110 x 10<sup>6</sup> UIA). Se neutraliza lo desadsorbido con NH<sub>3</sub> y concentra hasta 50 ml en el evaporador giratorio a ~ 20 mm Hg, y se precipita previamente con 40 ml de metanol bajo agitación (el precipitado es desechado) y se instila el filtrado bajo
10. agitación intensiva en 500 ml de alcohol seco. Se recoge el precipitado por filtración a succión, se lava con etanol y éter y se seca en vacío a la temperatura ambiente. Rendimiento: 4,9 g. con 14 x 10<sup>6</sup> UIA/g.  $\hat{=}$  34 % de rendimiento, calculado sobre la actividad de la solución de
15. partida.

Ejemplo 9.

Método del ensayo para la comprobación del efecto de inhibidores de amilasa en ratas y seres humanos.

20. Para provocar una hiperglucemia alimenticia por administración de almidón, unas ratas (n = 6) reciben 1 g. de almidón cocido/kg por vía bucal. Cada vez otras 6 ratas reciben, adicionalmente al almidón, el inhibidor de amilasa del Ejemplo 7, en la dosificación indicada. La glucosa de la sangre es determinada a los intervalos de tiempo indicados, después de la administración de
25. almidón, en la sangre del plexo venoso retroarbitrario con un analizador automático [Technicon, según Hoffman, J. biol, Chemi. 120, 51 (1937)]7.

30. Para provocar una hiperglucemia e hiperinsulinamia en seres humanos (n = 7 a 8), se les administran



5. 60 g. de almidón cocido. La glucosa de la sangre es determinada inmediatamente antes del comienzo del ensayo y a breves intervalos después, como arriba se ha indicado, en la sangre capilar de la yema del dedo. En ensayos ulteriores, la substancia activa es agregada a la suspensión de almidón.

10. Las determinaciones de insulina fueron efectuadas radioinmunológicamente en base al método de anticuerpo doble según Hales y Randle (Biochem. J. 88, 137 (1963)) en el suero de la sangre venosa.

Tabla 1 para el Ejemplo 9

Promedio de la glucosa en la sangre en mg/100 ml  $\pm$  1 s de ratas en ayunas a distintos tiempos después de la administración oral de almidón  $\pm$  substancia activa del Ejemplo 7.

	5	10	15
Testigo sin almidón	67 $\pm$ 4,9	74 $\pm$ 13	69 $\pm$ 5,0
testigo con almidón	111 $\pm$ 7,2	128 $\pm$ 9,1	142 $\pm$ 6,5
almidón + 0,02 mega UIA/kg	105 $\pm$ 8,8	<u>111 <math>\pm</math> 8,2</u>	<u>119 <math>\pm</math> 8,6</u>
almidón + 0,05 mega UIA/kg	<u>100 <math>\pm</math> 9,1</u>	<u>101 <math>\pm</math> 6,2</u>	<u>111 <math>\pm</math> 5,5</u>
almidón + 0,12 mega UIA/kg	<u>86 <math>\pm</math> 8,5</u>	<u>81 <math>\pm</math> 3,5</u>	<u>97 <math>\pm</math> 9,4</u>
almidón + 0,20 mega UIA/kg	<u>79 <math>\pm</math> 4,7</u>	<u>77 <math>\pm</math> 7,1</u>	<u>87 <math>\pm</math> 5,9</u>



Tabla 1 para el Ejemplo 9 (Cont.)

	20	30	45 minutos
Testigo sin almidón	68 ± 3,6	64 ± 8,1	55 ± 5,9
testigo con almidón	132 ± 8,7	132 ± 7,5	109 ± 8,1
almidón + 0,02 mega UIA/kg	118 ± 7,6 -----	108 ± 7,3 -----	100 ± 4,7
almidón + 0,05 mega UIA/kg	107 ± 5,3 -----	99 ± 7,9 -----	87 ± 10 -----
almidón + 0,12 mega UIA/kg	81 ± 7,8 -----	82 ± 8,9 -----	66 ± 4,8 -----
almidón + 0,20 mega UIA/kg	85 ± 4,5 -----	70 ± 4,6 -----	70 ± 2,5 -----

----- P < 0,05      ——— P < 0,01      ===== P < 0,001

en relación al testigo con almidón.



T A B L A 2 para el Ejemplo 9.

Promedio de la glucosa en la sangre en mg/100 ml  $\pm$  l s de personas de ensayo (P.e.) en ayunas antes (=0) y a distintos tiempos después de la administración oral de 60 g. de almidón  $\pm$  substancia activa del ejemplo 7.

	0	15	30	45
Testigo con almidón	96 $\pm$ 13	110 $\pm$ 19	159 $\pm$ 21	154 $\pm$ 23
almidón + 0,3 mega UIA/P.e.	99 $\pm$ 10	102 $\pm$ 15	<u>132 <math>\pm</math> 14</u>	<u>128 <math>\pm</math> 11</u>
almidón + 0,6 mega UIA/P.e.	88 $\pm$ 4,8	101 $\pm$ 6,3	<u>108 <math>\pm</math> 6,2</u>	<u>100 <math>\pm</math> 8,5</u>
almidón + 1,2 mega UIA/P.e.	93 $\pm$ 9,5	100 $\pm$ 11	<u>108 <math>\pm</math> 8,3</u>	<u>102 <math>\pm</math> 7,3</u>

	60	90	120	180 minutos.
Testigo con almidón	131 $\pm$ 34	99 $\pm$ 21	85 $\pm$ 15	80 $\pm$ 14
almidón + 0,3 mega UIA/P.e.	116 $\pm$ 16	98 $\pm$ 6,1	92 $\pm$ 12	86 $\pm$ 11
almidón + 0,6 mega UIA/P.e.	<u>95 <math>\pm</math> 8,6</u>	86 $\pm$ 6,4	78 $\pm$ 7,3	<u>93 <math>\pm</math> 6,4</u>
almidón + 1,2 mega UIA/P.e.	<u>98 <math>\pm</math> 9,8</u>	87 $\pm$ 8,5	88 $\pm$ 7,3	90 $\pm$ 6,2

----- P < 0,05      ——— P < 0,01      ===== P < 0,001

en relación al testigo con almidón.

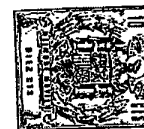


TABLA 3 para el Ejemplo 3.

Valores medios de insulina en  $\mu$  unidades/ml de suero de personas de ensayo (P.e.) en ayunas antes (=0) y a distintos tiempos de la administración oral de almidón  $\pm$  sustancia activa del Ejemplo 7.

	0	15	30	45
Testigo con almidón	10 $\pm$ 2,0	26 $\pm$ 14	64 $\pm$ 29	59 $\pm$ 22
almidón + 0,3 mega UIA/P.e.	11 $\pm$ 1,9	18 $\pm$ 4,6	<u>29 <math>\pm</math> 8,8</u>	<u>26 <math>\pm</math> 10</u>
almidón + 0,6 mega UIA/P.e.	11 $\pm$ 3,3	21 $\pm$ 6,0	<u>18 <math>\pm</math> 6,8</u>	<u>17 <math>\pm</math> 7,4</u>
almidón + 1,2 mega UIA/P.e.	8 $\pm$ 3,0	12 $\pm$ 5,9	<u>13 <math>\pm</math> 7,2</u>	<u>10 <math>\pm</math> 4,7</u>
	60	90	120	180 mi- nutos.
Testigo con almidón	31 $\pm$ 20	19 $\pm$ 14	12 $\pm$ 6,5	10 $\pm$ 5,2
almidón + 0,3 mega UIA/P.e.	22 $\pm$ 11	15 $\pm$ 5,3	14 $\pm$ 3,1	11 $\pm$ 2,4
almidón + 0,6 mega UIA/P.e.	<u>14 <math>\pm</math> 6,8</u>	13 $\pm$ 3,7	11 $\pm$ 3,4	10 $\pm$ 2,5
almidón + 1,2 mega UIA/P.e.	<u>8 <math>\pm</math> 2,9</u>	8 $\pm$ 4,0	9 $\pm$ 3,3	6 $\pm$ 3,0

----- P < 0,05      ——— P < 0,01      ===== P < 0,001

en relación al testigo con almidón.



Figura 1.

Adsorción de colorantes y del principio inhibidor de amilasa sobre carbón activo desde soluciones de cultivo de la cepa SE 50/13.

5. Las curvas 1 y 2 representan las actividades en UIA/ $\mu$ l (eje y derecho), curva 1 al pH = 2,1, curva 2 al pH 6,5, después del tratamiento con la cantidad de carbón activo indicada en g. sobre el eje X.

10. Las curvas 3 y 4 señalan las extinciones a 550 nm (eje e izquierdo) después del tratamiento con la cantidad de carbón activo indicada sobre el eje X; curva 3 al pH = 6,5, curva 4 al pH = 2,1.

N O T A

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una

20. Solicitud de Patente, presentada en Alemania, con fecha 1 de marzo de 1972, bajo el número P 22 09 833.5; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita

25. Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN INHIBIDOR DE AMILASA; caracterizándose por lo siguiente:

30. 1.- Procedimiento para la producción de un inhibidor de amilasa, caracterizado porque se prepara según métodos en si conocidos a partir de una variante de



la cepa de actinoplanácea SE 50 perteneciente al orden de actinomicetales, a saber, de la cepa SE 50/13, así como de sus mutantes y variantes.

5. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se cultiva la cepa SE 50/13 en soluciones de cultivo con un contenido de almidón de más de 2 %, preferiblemente de 4 a 6 %.

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se adsorbe la cantidad principal de los colorantes de impureza de la solución de cultivo a valores pH ácidos, preferiblemente al pH = 1 a 3, selectivamente sobre carbón.

15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se distribuyen cultivos de la cepa de actinoplácea SE 50 sobre un medio de cultivo de agar y se someten a la incubación durante varios días, preferiblemente a 28° C.

20. 5.- Procedimiento para la producción de un inhibidor de amilasa, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 18 hojas escritas a máquina por una sola cara.

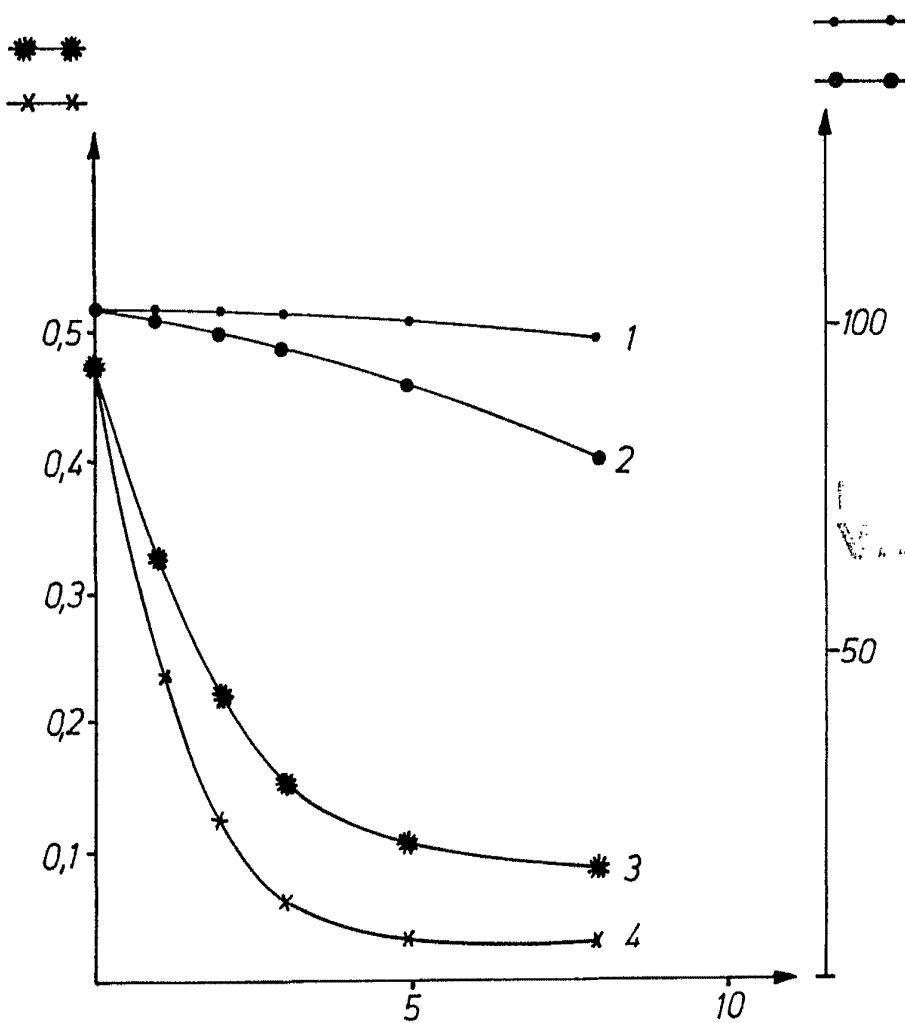
Madrid, 27 FEB. 1973

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GOMEZ ACEBO Y MODET  
p. p. Firmador L. Goeta Ferrández



412096



27 FEB. 1973

Medico

L. GOMEZ ACEDO Y COLA  
Dr. Elmadad L. Gomez y cols.