

359916

P.- 39.922

B 65 27
Case P.O. 5035A
L.H. (SDG)

Memoria descriptiva



269.8 2 FNE. 1968

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CHAS. PRIZER & CO., INC.

SECCION TECNICA	
REGISTRACION I.P.G.	
CLASE B	01
SUBCLASE D	

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en 235 East 42nd Street, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR Y CONCENTRAR LA EN-
ZIMA DE COAGULACION DE LA LECHE" (Clase Internacional
C12k B01d).

22.12.68

- 1 -

POOR
QUALITY



5 Este invento se refiere a un procedimiento para purificar enzimas y , más particularmente, a un procedimiento para eliminar agua, sales inorgánicas y compuestos orgánicos desde soluciones de la enzima suavemente proteolítica producida por Endothia parasitica y de la enzima proteolítica producida por Bacillus subtilis, así como desde soluciones de otras enzimas.

10 Las enzimas son artículos importantes del comercio químico, útiles en muchas reacciones químicas y bioquímicas. Para utilizarse en muchos procedimientos y para fines de almacenamiento y transporte, es necesario frecuentemente obtener las enzimas en formas cristalinas relativamente puras o en la forma de soluciones relativamente concentradas. Además, muchas aplicaciones requieren la
15 utilización de enzimas que estén libres de las sales inorgánicas y de los residuos orgánicos que pueden resultar mezclados con las enzimas, especialmente cuando las enzimas son producidas por procedimiento de fermentación.

20 La necesidad de enzimas en formas no adulteradas (sin mezcla) ha creado una necesidad de procedimientos de concentración y de purificación para producir estas formas. Procedimientos típicos de la técnica anterior han implicado evaporación en vacío de soluciones de enzima derivadas de caldos de fermentación filtrados para obtener concentración, y cristalizaciones y precipitaciones
25 fraccionadas sucesivas para purificar las enzimas.

30 Procedimientos tales como estos no han sido enteramente satisfactorios debido a los hechos de que las enzimas son frecuentemente inestables térmicamente y se descomponen, con consiguientes pérdidas de rendimiento, a



5 las temperaturas de evaporación, y de que la cristaliza-
ción y precipitación son procedimientos inherentemente mo-
lestos que implican separaciones incompletas y pérdidas de
solución al lavar. Las pérdidas por descomposición térmi-
ca no son evitadas eficazmente, incluso cuando se utilizan
presiones extremadamente bajas, dado que una gran porción
de la solución que se evapora entre en contacto con las su-
perficie de caldeo del evaporador relativamente calien-
tes. Además, un control descuidado de la temperatura de
10 evaporación, incluso durante unos pocos minutos, puede
dar como resultado caldeos excesivos que pueden destruir
una gran cantidad de enzima.

Los procedimientos de ósmosis inversa de este
invento proporcionan un medio para concentrar soluciones
15 de enzima sin altas pérdidas térmicas de rendimiento con-
comitantes, y un medio para eliminar sales e impurezas or-
gánicas desde soluciones de enzima, con completamiento sus-
tancial, sin las indebidas pérdidas mecánicas y de solu-
ción que son inherentes a los procedimientos de precipi-
tación y filtración. Por ejemplo, cuando el procedimiento
de ósmosis inversa de este invento es incorporado en un
procedimiento para producir una enzima coaguladora de la
leche suavemente proteolítica por fermentación con Endo-
thia parasitica, suatancialmente de acuerdo con las ense-
25 ñanzas de la patente USA núm. 3.275.453, el nuevo proce-
dimiento, que tiene un rendimiento superior a 82%, puede
reemplazar a una operación de evaporación y precipitación
que tiene un rendimiento de solamente 60 a 65%. Así, la
utilización de un procedimiento de este invento puede pro-
30 porcionar una ganancia de rendimiento de aproximadamente



20%.

Además, los nuevos procedimientos de este invento implican aparatos más simples y menos costosos que los procedimientos de la técnica anterior utilizados para la purificación y concentración. Finalmente, los procedimientos de este invento son aplicables de manera más ventajosa a los esquemas globales de tratamiento continuo que se necesitan para la producción rentable de enzimas por fermentación.

Resumen del invento.

Este invento crea un procedimiento para purificar y concentrar enzimas por utilización de un procedimiento de ósmosis inversa, con el que una solución de la enzima es expuesta a una cara de una membrana semipermeable, estando la solución bajo una presión suficiente para hacer que el agua, u otro disolvente, fluya desde la solución a través de la membrana. La membrana, que permitirá un paso sustancialmente completo a través de ella de disolventes, sales inorgánicas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, pero que impedirá un paso sustancial a través de ella de compuestos que tengan pesos moleculares superiores a aproximadamente 35.000, es preferiblemente del tipo compuesto por acetato de celulosa o del tipo complejo de polielectrolito que contiene grupos aniónicos de poliestireno-sulfonato y grupos catiónicos de polivinilbenciltrimetilamonio. Enzimas preferidas, con las que son útiles estos nuevos procedimientos, incluyen la enzima coaguladora de la leche suavemente proteolítica producida por Endothia parasitica y la enzima proteolítica producida por Bacillus subtilis. Las presiones de trabajo preferidas os-



5 cilan entre 7 y 52,5 kg/cm² manométricos. La destrucción
térmica de enzimas sensibles puede ser hecha mínima reali-
zando el procedimiento de ósmosis inversa a bajas tempera-
turas, que oscilan desde justamente por encima del punto
de congelación de la solución hasta aproximadamente 18°C,
pero el nuevo procedimiento puede ser realizado a cualquier
temperatura hasta la temperatura a la que la enzima resul-
ta inactivada o destruída.

10 Además, se ha encontrado que soluciones de en-
zima concentradas por ósmosis inversa son sorprendentemen-
te apropiadas para secar, incluso a temperaturas elevadas
tales como las que se emplean en procedimientos de secado
por pulverización, mientras que soluciones de enzima concen-
15 tradas por procedimientos convencionales de evaporación
adolecen de pérdidas que se aproximan a una destrucción
cuantitativa de la actividad después de dicho secado adi-
cional.

20 Breve descripción de los dibujos. En los dibu-
jos, la figura 1 es un organigrama simplificado de una rea-
lización del procedimiento de ósmosis inversa de este
invento; la figura 2 es una sección transversal del módu-
lo de ósmosis inversa útil con el procedimiento de este
invento.

25 Descripción detallada del invento. Este invento
se refiere a un procedimiento para purificar y concentrar
enzimas eliminando el disolvente en exceso y otras impure-
zas de bajo peso molecular con la utilización de un proce-
dimiento de ósmosis inversa. El procedimiento de ósmosis
inversa realiza la separación de las enzimas desde el di-
30 solvente y otras impurezas por utilización de una membrana



5 semi-permeable que permite el paso a su través del disolvente de peso molecular relativamente bajo y de moléculas de impurezas, al mismo tiempo que impide el paso de las enzimas de peso molecular relativamente alto. El flujo o difusión de compuestos de bajo peso molecular a través de la membrana es provocado por la aplicación de presión a la solución de enzima original en contacto con la cara de la membrana.

10 La concentración de soluciones de enzima impuras por ósmosis inversa se ha encontrado que ejerce un efecto profundo sobre la facilidad con la que pueden ser secados dichos productos. Por eliminación de una proporción sustancial de impurezas incidentales presentes en los caldos de cultivo de fermentación, se ha encontrado que la ósmosis inversa produce concentrados de enzima que pueden ser secados incluso a temperaturas elevadas tales como las que se emplean en el secado por pulverización. Esto es particularmente inesperado en vista del hecho de que, mientras que los caldos de cultivo de fermentación que contienen enzimas pueden ser concentrados por evaporación a baja temperatura bajo vacío sin pérdida sustancial de actividad, el subsiguiente secado por pulverización de dichos concentrados de evaporación da como resultado normalmente una pérdida casi completa de actividad de enzima.

25 Este invento es útil para separar enzimas de peso molecular relativamente alto desde disolventes, sales inorgánicas e impurezas de peso molecular relativamente bajo. El invento puede ser utilizado para concentrar enzimas eliminando solamente el disolvente en exceso en que se disuelve la enzima, o el invento puede ser utilizado a la

30



56 vez para la concentración y purificación de enzimas elimi-
nando las impurezas orgánicas e inorgánicas de bajo peso
molecular así como el disolvente en exceso. La diferencia
requerida entre los pesos moleculares de los compuestos
difundidos y los compuestos no difundidos, o retenidos es
controlada por la naturaleza de la membrana utilizada, tal
como se bosqueja más abajo. Con cuestión general, las mem-
branas útiles con este invento serán las que retienen com-
puestos que tienen un peso molecular igual o algo menor
10 que el de la enzima que es purificada y que dejan pasar
compuestos que tienen un peso molecular igual o algo mayor
que el de las impurezas que son eliminadas. Dado que debe
existir una diferencia de peso molecular entre los mate-
riales que han pasado por la membrana y los retenidos por
15 ella, los pesos moleculares de las enzimas que han de ser
purificadas y los pesos moleculares de las impurezas que
han de ser eliminadas deben ser significativamente diferen-
tes. Según progresa la tecnología de las membranas, sin
embargo, puede disminuirse la diferencia requerida entre
20 los pesos moleculares de compuestos difundidos y reteni-
dos, y serán posibles separaciones más nítidas.

Enzimas típicas útiles con este procedimiento
tienen pesos moleculares dentro del margen de 40.000 a
50.000 y están asociadas con disolventes y con impurezas
25 que tienen pesos moleculares de 1000 a 5000, o inferiores.
En estos casos, igual que en otros, los técnicos en la ma-
teria tendrán poca dificultad para seleccionar una membra-
na para utilizarse en este invento que retenga una propor-
ción principal de la enzima y que deje pasar la mayor par-
30 te de las impurezas.



1969

5 El límite inferior de peso molecular de las enzimas retenidas por una membrana dada no está definido únicamente y, tal como se indica más abajo, una membrana puede dejar pasar una porción del material por encima del límite inferior de separación o fraccionamiento. Sin embargo, es posible llevar a cabo el procedimiento de este invento de diversas maneras para lograr grados comparables de purificación con membranas con diferentes características de retención. Así, por ejemplo, una membrana que retenga solamente 80% de los solutos con pesos moleculares superiores a 10.000 puede utilizarse también, en un procedimiento de ósmosis inversa de segunda etapa, para retener 80% del 20% que pasó a través de la etapa inicial, realizando de esta manera la recuperación de 96% del soluto total con peso molecular superior a 10.000. La utilización de procedimientos de múltiples etapas, con recirculación apropiada de las corrientes parcialmente separadas, para lograr estos grados de purificación es familiar para los técnicos en los ramos de procedimientos de separación, y los procedimientos de ósmosis inversa de este invento pueden emplearse en un modo de múltiples etapas, dentro del alcance de este invento. Similarmente, este invento abarca la utilización de una serie de membranas, con diferentes niveles de fraccionamiento de peso molecular, para lograr las separaciones deseadas.

25 Este invento es particularmente aplicable a la enzima coaguladora de la leche suavemente proteolítica producida por Endothia parasitica. Un procedimiento para preparar esta enzima coaguladora de la leche, que se utiliza en la fabricación de quesos, está dado en la patente USA



número 3.275.453. Esta enzima, que se requiere en forma relativamente pura, es aislada desde caldos de cultivo de fermentación que también contienen grandes cantidades de agua así como carbohidratos no fermentados, azúcares, materiales colorantes, aminoácidos y sales inorgánicas, incluyendo fosfatos y sales de magnesio y de potasio. Los procedimientos de la técnica anterior utilizan procedimientos de evaporación, precipitación y cristalización fraccionada para aislar la enzima desde el agua y las impurezas, con graves pérdidas de rendimiento asociadas. Los nuevos procedimientos de este invento eliminan enteramente el antiguo procedimiento de evaporación, con sus pérdidas de producto asociadas por destrucción térmica de aproximadamente 20%, y también eliminan diversas etapas de precipitación, lavado y filtración, con sus pérdidas de rendimiento asociadas adicionales. Cuando el nuevo procedimiento es realizado a la temperatura ambiente, la pérdida de rendimiento total global es usualmente de aproximadamente 10 a 15% y puede ser tan pequeña como 4 a 7%. Estas pérdidas pueden ser reducidas adicionalmente realizando el nuevo procedimiento a temperaturas más bajas, que oscilan desde el punto de congelación de la solución hasta aproximadamente 18°C, o utilizando una segunda membrana para eliminar cualquier enzima desde el producto difundido.

Los procedimientos de este invento son también particularmente útiles para purificar y concentrar la enzima proteolítica producida por Bacillus subtilis. Esta enzima, que es útil en la limpieza de productos textiles y como parte de preparados detergentes para utilización doméstica, es producida por fermentación en combinación



con agua e impurezas orgánicas e inorgánicas. La concentración, por eliminación del agua, y la purificación pueden realizarse ambas utilizando el procedimiento de este invento. Una forma de la enzima, producida para utilizarse como un aditivo para detergentes, es Maxatase (marca comercial registrada), que es fabricada por la firma Royal Netherlands Fermentation Industries, Ltd. de Delft, Holanda.

La separación de las porciones deseables e indeseables de la solución de enzima original se realiza, en este invento, utilizando ósmosis inversa. La ósmosis inversa, tal como se utiliza aquí, se refiere a un procedimiento en que el agua, o un disolvente, es hecha fluir desde una solución, a través de una membrana semi-permeable, por la aplicación de presión. El flujo de disolvente está acompañado por un flujo de una parte, pero no de la totalidad, de las sustancias disueltas en él. Tal como se utiliza aquí, se pretende que el término ósmosis inversa incluya los procedimientos citados como "ultrafiltración". El término de ósmosis inversa no está limitado, en general o tal como se utiliza aquí, al agua como disolvente sino que incluye también otros disolventes. El procedimiento de ósmosis inversa ha de ser diferenciado también de la diálisis en que una sustancia disuelta se difunde a través de una membrana semi-permeable bajo la influencia o fuerza impulsora de solamente un gradiente de concentración.

En el procedimiento de ósmosis inversa, se utiliza una membrana semi-permeable para separar materiales de diferentes pesos moleculares. La solución original, que contiene la enzima y el disolvente en exceso indeseable,



Usualmente agua e impurezas orgánicas e inorgánicas, y que pueden ser el caldo de cultivo de fermentación filtrado en el que se produjo originalmente la enzima o puede ser otra solución de enzima, es expuesta, a una cara de la membrana bajo una presión hidráulica exteriormente aplicada. Con-
5 siguientemente, existe una diferencia de presión a lo largo del espesor de la membrana. Esta presión hace que el agua, u otro disolvente de bajo peso molecular, fluya a través de la membrana arrastrando con ella las sales y otras
10 impurezas en una concentración, en general algo o, a veces, sustancialmente menor que la de la solución inicial. La concentración de las impurezas en el agua que fluye a través de la membrana depende, generalmente, de la naturaleza de la membrana, de la concentración de la solución inicial y de la presión empleada. Se deberá hacer observar
15 que altos caudales son útiles en la osmosis inversa, ya que se encuentra que el caudal neto de impurezas aumenta con caudales crecientes de agua o de disolvente sin un aumento correspondiente en el caudal, a través de la membrana, de las enzimas deseables. Con los tipos "más porosos"
20 de membranas, se encuentra algunas veces que los caudales son tales que la concentración de impurezas en la corriente difundida, que ha pasado a través de la membrana, es casi idéntico a la concentración en la corriente inicial. Esto es contrario a la situación en el procedimiento de diálisis en que el caudal del soluto difundido es proporcio-
25 nal a la diferencia de concentración a través de la membrana, y se transferirá poca cantidad de soluto a través de la membrana con diferencias de concentración que se aproximen a cero.
30



5 Dependiendo de la naturaleza de la membrana utilizada, se arrastran junto con el agua, a través de la membrana dentro del producto difundido, cantidades sustanciales de las sales indeseables y de las impurezas de bajo peso molecular, logrando de esta manera la deseada separación de las impurezas desde la enzima que queda detrás en el producto retenido.

10 No se exige que la cara no sometida a presión de la membrana esté expuesta a disolvente puro o a solución exenta de enzima, para el funcionamiento eficaz de este procedimiento. El gradiente de presión a través del espesor de la membrana es el único gradiente aplicado exteriormente requerido. Así, el disolvente y las impurezas que
15 pasan a través de la membrana pueden ser hechos salir fuera de la cara no sometida a presión tan pronto como se hayan difundido dentro de ella desde la cara de la membrana sometida a presión.

20 La presión hidráulica que es aplicada a la solución original y es transmitida a la cara de producto retenido de la membrana, es seleccionada teniendo en cuenta muchas variables. Como cuestión general, la presión utilizada debe superar la diferencia entre la presión osmótica de la solución de enzima sobre el lado sometido a presión de la membrana y la presión osmótica de la solución relativamente exenta de enzimas del lado de baja presión de la
25 membrana. Generalmente, mayores presiones darán como resultado mayores velocidades de difusión de impurezas y de disolventes a través de la membrana hasta un cierto valor máximo dependiendo de la membrana y son, consiguientemente
30 deseables.



La magnitud del límite inferior de presión depende de muchos factores, y especialmente de la naturaleza de la membrana utilizada. La más baja presión útil puede ser por lo tanto de unas pocas décimas de kilogramo por cm^2 en el caso de una membrana muy porosa de mala selectividad, o de varios kilogramos por cm^2 para una membrana relativamente "compacta" de alta selectividad.

El límite superior de la presión está establecido por la naturaleza mecánica de la membrana, y la membrana debe estar construída o soportada de una manera que la permita aguantar o soportar la presión hidráulica que es aplicada sobre una de sus caras. Típicamente, para utilizarse en este invento, una membrana plana puede estar soportada por una placa de respaldo porosa, o una membrana de sección transversal anular puede estar soportada estando depositada sobre la superficie interior de un tubo poroso. Desde luego, otros métodos de soporte, tales como membranas auto-soportadas que consisten en tubos de pared relativamente gruesa y de pequeño diámetro interior, tales como fibras huccas, se pueden utilizar también. La presión útil está limitada también por el hecho de que la membrana propiamente dicha, puede ser comprimida contra su propio soporte a altas presiones, y consiguientemente puede perder algo de su capacidad de dejar pasar compuestos de bajo peso molecular.

Los técnicos en la materia serán capaces de seleccionar presiones de trabajo apropiadas para utilizarse en la realización de este invento, Las presiones utilizadas dependerán del grado de separación deseado, de la naturaleza de las impurezas, del tipo de membrana utilizada,



asi como de otros factores.

5 Como cuestión general, las presiones útiles con este invento oscilan entre 7 y aproximadamente 105 kg/cm² manométricos, el límite de los aparatos actualmente utili-
zados para la desalinización de aguas salobres. Son tam-
bién posibles presiones más altas, estando establecidas
las limitaciones por los límites del equipo. Se prefiere
utilizar presiones desde 2,1 a 70 kg/cm² manométricos y
de la mejor manera se prefieren presiones de 7 a 52,5 kg/cm²
10 manométricos con las membranas de acetato de celulosa que están incluídas en una realización del presente invento, Con membranas del tipo de complejo de polielectrolito, se pueden utilizar eficazmente, también, presiones más bajas, en la proximidad de 3,5 a 7 kg/cm² manométricos.

15 Las membranas semi-permeables útiles con este invento son aquellas que, bajo la influencia de un gradiente de presión suficientemente grande, permitirán que existan flujos relativamente grandes de disolventes e impurezas de peso molecular bajo a través de ellas, al mismo tiempo
20 que permiten poco o ningún flujo de la enzima producto, Estas membranas realizan la separación permitiendo que com-
puestos por debajo de un peso molecular especificado pasen a su través con facilidad, y haciendo mínimo o eliminando el flujo de compuestos por encima de un peso molecular es-
25 pecificado. Membranas de este tipo pueden ser preparadas con un "fraccionamiento" de peso molecular que puede variar dentro de un amplio margen. Así, una membrana particu-
lar puede dejar pasar compuestos de peso molecular inferior a 3000 dentro del producto difundido y pueden retener com-
30 puestos de peso molecular superior a este nivel dentro del



5
10
15

producto retenido. El "fraccionamiento" de peso molecular no es nítido, y será retenida una porción de algunos compuestos con pesos moleculares por debajo del "fraccionamiento" y, a veces, pasarán algunos compuestos con pesos moleculares por encima del "fraccionamiento". La separación es relativa, y en general, la nitidez de la separación aumenta según disminuye o aumenta el peso molecular de los compuestos desde el nivel de "fraccionamiento" de peso molecular de la membrana particular. Otras consideraciones, tales como la naturaleza química del compuesto difundido particular implicado, pueden influir sobre el grado de permeabilidad de una membrana particular. Así, por ejemplo, sales inorgánicas de un peso molecular dado pueden difundirse a través de una membrana dada con mayor facilidad que un compuesto orgánico de peso molecular similar, o viceversa.

20

Las membranas preferidas, que son útiles en la práctica de este invento, son las del tipo de acetato de celulosa poroso de alto flujo frecuentemente citadas en la bibliografía que trata de la ósmosis inversa como "membranas del tipo Loeb" y pueden ser producidas por métodos bien conocidos para los técnicos en la materia de preparación de membranas para ósmosis inversa.

25

Por ejemplo, los métodos de Loeb y otros, descritos en las patentes USA 3.133.132 y 3.133.137 y los Manjikian (Report nº 65-13, Department of Engineering, Universidad de California, Los Angeles, Marzo de 1965 y en Ind.

30

Eng. Chem., Product Research and Development, 6, nº 1, 23-32 (1967), pueden ser utilizados con las modificaciones apropiadas para hacer a la membrana resultante permeable a



las sales univalentes comunes tales como cloruro de sodio. Es bien conocido para los técnicos en el ramo de la ósmosis inversa que el grado de carácter de retención de sal de las membranas preparadas por los métodos citados está intimamente relacionado con la temperatura empleada en la etapa de recocido final, que comprende sumergir la membrana en agua a una temperatura especificada durante un cierto período de tiempo. Así, por ejemplo, Manjikian (Ind. Eng. Chem. Produc Research and Development, 6, núm. 1 23-32 (1967), ha preparado membranas (1) preparando una solución que comprende 25% de acetato de celulosa (Eastman E-398-3), 45% de acetona y 30% de formamida, (2) colando una película a partir de esta solución sobre vidrio plano a 23°C, (3) permitiendo que parte del disolvente se evapore desde la película colada durante un período de 30 segundos a 23°C, (4) sumergiendo la película en agua de 0 a 3°C durante una hora, y (5) curando o recociendo la membrana resultante por inmersión en agua a una temperatura especificada durante 5 minutos. Cuando se varió la temperatura de recocido, las membranas resultantes mostraron diversos grados de capacidad de desalinización, tal como se muestra por los resultados de ensayo en la Tabla I tomada de la Tabla 7 de la referencia), Estos resultados se obtuvieron en una celda o cuba de ensayo de laboratorio hecha funcionar a 42 kg/cm² manométricos sobre una salmuera de alimentación que contiene 5000 ppm. de cloruro de sodio.

5

10

15

20

25

30

23.12.68



Tabla I. Efecto de la temperatura de curado sobre el rendimiento de la membrana

Membrana	Temperatura de curado °C	Flujo, litros/m ² /día	Contenido de sal, ppm.
A	No encontrado (23°C)	3990	3800
B	70	1890	800
C	76	1260	250
D	78	714	110
C	81	504	85

Se ha encontrado que las membranas no calentadas, que muestran mala capacidad de desalinización, similares a la membrana A de la Tabla I, permiten sorprendentemente que sales y otras impurezas de bajo peso molecular, tales como azúcares y compuestos orgánicos, pasen a su través con facilidad juntamente con agua, cuando soluciones de enzima que contienen dichas sales y otras impurezas son sometidas a presión sobre un lado de la membrana, mientras que son retenidas enzimas de alto peso molecular. También se pueden utilizar membranas con capacidad de desalinización intermedia entre las de A y B de la Tabla I, por ejemplo, una calentada a 50°C, aunque las sales y otras impurezas no se difunden a través de dichas membranas con tanta rapidez.

Este invento no está restringido, sin embargo, a membranas de acetato de celulosa del tipo antes descrito. Diversos fabricantes preparan y ofrecen a la venta membranas con diferentes propiedades de desalinización. Las membranas de acetato de celulosa útiles en este inven-



to son las citadas generalmente como "sueltas" "abiertas" "de estructura abierta" o "más porosas". No están caracterizadas por el diámetro de poros ni por cualquier otra propiedad física simple sino que sus características de retención de soluto y de caudal son similares a las de membranas producidas por los métodos descritos en las publicaciones antes mencionadas y estas características pueden ser hechas variar de manera similar. Entre los fabricantes que ofrecen membranas apropiadas o que ofrecen membranas que pueden ser adaptadas, tal como se ha indicado anteriormente, para utilizarse en este invento, se encuentran: Havens Industries, San Diego, California; Desalination Systems, Inc., Escondido, California; Universal Water Corporation, Del Mar, California; Aerojet-General Corporation, Azusa, California; la General Atomic Division of General Dynamics Corporation, San Diego, California; y American Standard Inc. de New Brunswick, Nueva Jersey.

Por lo tanto es una cuestión simple para uno que desea practicar este invento seleccionar una membrana apropiada entre las disponibles. En algunos casos, puede ser posible tratar una membrana, que muestra excesiva retención de sales, disolventes u otras impurezas, con un agente de hinchamiento, tal como perclorato de magnesio disuelto en agua, para hacerla más permeable a los disolventes e impurezas. Las membranas del tipo de acetato de celulosa son solo uno de los tipos de membranas que son preferibles para utilizarse con el presente invento, y el alcance de este invento no está restringido a este tipo de membranas.

Otro tipo de membranas que se prefiere para utilizarse en el presente invento es una membrana del tipo



de complejo de polielectrolito tal como las producidas por la Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts, que contienen grupos aniónicos de poliestireno sulfonato y grupos catiónicos de polivinilbenciltrimetilamonio, tal como se describe por A. S. Michaels en Ind. Eng. Chem. 57 (10), 32-40 (1965). Estas membranas están disponibles bajo nombres comerciales tales como Diaflo UM-1 Diaflo UM-2, Diaflo UM-3 y Diaflo KM-50.

Las membranas pueden ser fabricadas también a partir de otros derivados de celulosa, a partir de copolímeros de mono- y di-acrilatos de etilenglicol con metacrilato de metilo, y pueden ser de carácter catiónico o aniónico o no iónico. También se pueden utilizar membranas compuestas por nylons sustituidos, igual que membranas compuestas por otros ésteres de celulosa formadores de película.

La figura 1 es un dibujo esquemático de una realización de los procedimientos de este invento. En la figura 1, la solución original de enzima es mantenida en un depósito de alimentación 1 que puede ser refrigerado para evitar degradación térmica. Desde el depósito de alimentación 1, la solución de enzima es llevada a una bomba de puesta a presión y circulación 2. La bomba 2 es una bomba de desplazamiento positivo de alta presión que se utiliza para poner a presión los tubos de fibra de vidrio dentro del módulo de ósmosis inversa 3, y se utiliza para crear el flujo a través del módulo. La presión dentro del tubo de fibra de vidrio 4 puede ser creada también por utilización de aire, nitrógeno o gases similares comprimidos. A partir de la bomba, la solución original es hecha fluir



hacia el interior de un tubo de fibra de vidrio poroso
4. La superficie interna de este tubo está recubierta con
una membrana semi-permeable 5. El tubo de fibra de vidrio
4 recubierto con la membrana 5 es fabricado para resistir
la presión que es creada por la bomba 2. Cuando el líquido
original fluye a través del centro del tubo de fibra
de vidrio, una porción del líquido pasa a través de la mem-
brana semipermeable 5, a través de las paredes del tubo
de fibra de vidrio poroso 4, y dentro del volumen anular
vacío 6 que rodea al tubo de fibra de vidrio 4 recubierto
con membrana. Este líquido difundido, compuesto por agua
o disolvente en exceso y por sales inorgánicas y compuestos
orgánicos de bajo peso molecular, es recogido en el volú-
men anular 6 y es hecho circular dentro de un depósito co-
lector de producto difundido 7 o es desechado. La porción
exterior del volumen anular 6 está rodeada por un tubo rí-
gido 8 que sirve para soportar el tubo de fibra de vidrio
4 y para retener el producto difundido hasta que este sea
desechado o pase al depósito colector de producto difundi-
do 7. El líquido retenido, es decir el líquido que contie-
ne la enzima, que no se difunde a través de la membrana 5
y del tubo 4. fluye desde el extremo 9 del tubo de fibra
de vidrio 4, a través de una válvula de reducción de presión
10 y puede ser devuelto, a través de una conducción de re-
circulación 11, al depósito de alimentación 1 para ulterior
concentración y purificación. Alternativamente, el líquido
retenido puede ser hecho fluir a un depósito separado 12
o puede ser preparado para ulterior tratamiento.

Modificaciones de este aparato pueden incluir la
utilización de una envolvente o funda de soporte común 8



que contenga un grupo de tubos de fibra de vidrio y recubiertos con membrana u que recoja el líquido desde todos estos tubos 4. Otra realización de este invento implicaría la utilización de baterías de fundas de soporte 8, conectadas en serie o en paralelo o en una combinación de serie y paralelo, que contiene grupos de tubos de fibra de vidrio recubiertos 4, conectados en serie. Una modificación adicional puede implicar la utilización de refrigerantes de circulación o un baño de refrigeración, que rodea las fundas de soporte 8, lo cual haría mínimas las pérdidas de rendimiento por degradación térmica, permitiendo que el procedimiento trabajase a una baja temperatura. El trabajo a temperaturas elevadas, por debajo de la temperatura de degradación de la enzima implicada, está también considerada dado que dichas temperaturas pueden ser deseables para aumentar el caudal a través de la membrana.

La figura 2 ilustra una funda única 8 que contiene un único tubo de fibra de vidrio 4, en sección transversal. En esta figura la funda exterior es denominada por 8, el líquido difundido que ha fluido a través de la membrana 5 y del tubo de fibra de vidrio 4 está indicado por 14. El tubo de fibra de vidrio 4 y la membrana permeable 5 están mostradas rodeando el espacio interior 15 que está completamente lleno con líquido original, bajo presión, y que ha sido agotado parcialmente de componentes de bajo peso molecular.

La solución de enzima utilizada como alimentación inicial para los procedimientos de este invento no necesita ser preparada a partir de enzimas comercialmente disponibles o purificadas. El material inicial puede ser encinas



parcialmente purificadas o una solución de enzimas obtenida de una etapa anterior de la fabricación o del procedimiento de fermentación.

5 Los siguientes ejemplos están dados solamente con fines de ilustración y no han de ser considerados como limitativos de este invento, siendo posibles muchas variaciones del mismo sin apartarse del espíritu o alcance del mismo.

10 Ejemplo I.— Un volumen de caldo de cultivo de fermentación, que totaliza aproximadamente 627 litros, fué preparado a partir del material que resultó de un procedimiento de fermentación llevado a cabo sustancialmente tal como se considera en la patente USA 3.275.453. El caldo de cultivo, que contenía la enzima coaguladora de la leche suavemente proteolítica producida por el hongo de la especie

15 *Endothia parasitica*, fué preparado filtrando caldo de cultivo crudo para eliminar el material grueso y sometiendo al caldo de cultivo filtrado a una segunda filtración a través de un auxiliar de filtración de tierra de diatomeas Super-Cel. El caldo de cultivo filtrado y clarificado fué alimentado, en partes alicuotas, al depósito de alimentación de un aparato de osmosis inversa. El aparato de ósmosis inversa era, en principio, sustancialmente idéntico al aparato descrito en la figura 1. El depósito de alimentación, que estaba refrigerado, mantenía al caldo de cultivo a aproximadamente 25°C. La unidad de ósmosis inversa fué suministrada por la firma Havens Industries de San Diego, California, y consistía en 35 tubos de fibra de vidrio porosos, de aproximadamente 13 mm de diámetro de 2,4 m de

25 longitud, conectados en serie y que proporcionan un área

30



de superficie interior de aproximadamente 2,83 m². Sobre la superficie interior de cada tubo de fibra de vidrio se había depositado una membrana de acetato de celulosa modificado que permitía el paso a su través de agua, sales inorgánicas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular (nominalmente, por debajo de aproximadamente 5000) al mismo tiempo que retenía cantidades de materiales, incluyendo la enzima, de peso molecular sustancialmente mayor el peso molecular probable de la enzima es de 40.000 a 50.000). Se encontró que algo de enzima pasaba sin embargo, a través de la membrana. Los tubos de fibra de vidrio fueron preparados por Havens Industries y la membrana era la membrana del tipo 2 A-4 suministrado por ésta. La membrana era equivalente, en propiedades de retención de sal, a las membranas del tipo Loeb "más porosas" antes descritas, y no fué preparada específicamente para aplicaciones de purificación o concentración de enzimas. Se sabía que la membrana tenía malas propiedades de retención de sal. Los tubos de fibra de vidrio poseían paredes porosas, de manera que cualquier cantidad de líquido y de soluto que pasaba a través de las membranas 2A-4 aplicadas como recubrimiento sobre las paredes fluía con facilidad a través de las paredes de los tubos de fibra de vidrio. En la unidad que se utilizó siete tubos de fibra de vidrio, conectados en serie en sus extremos, estaban soportados en un tubo exterior separado, en el cual el fluido que pasaba a través de los tubos de fibra de vidrio recubiertos con membrana, era recogido, y desde el cual se retiraba el fluido difundido para almacenamiento separado. Se utilizaron en este procedimiento cinco módulos, compuesto cada uno por un tubo exterior que contenía siete tubos



de fibra de vidrio.

El caldo de cultivo fué bombeado a través del aparato con un caudal de aproximadamente 8 litros por minuto bajo una presión, creada por una bomba de pistón y mantenida por una válvula de contrapresión, que oscilaba entre 9,3 y 12,8 kg/cm² manométricos, La Presión fué aplicada al interior de los tubos de fibra de vidrio porosos y el caldo de cultivo filtrado llenaba completamente estos tubos cuando fluía a su través. La solución que pasó y se difundió a través de los tubos de fibra de vidrio fué recogida, analizada y desechada. La porción de la solución que no pasó a través del recubrimiento de membrana de la superficie interior de los tubos de fibra de vidrio fué devuelta al depósito de alimentación y fué recirculada a través del aparato de ósmosis inversa. El procedimiento de concentración y de recirculación se llevó a cabo durante aproximadamente 8,75 horas, durante el cual la velocidad de difusión disminuyó desde 2600 ml/minuto hasta 710 ml/minuto. El volumen de solución que se difundió a través de la membrana totalizó 575 litros y el volumen de la solución que no se difundió a través de la membrana totalizó 46,9 litros= La enzima que pasó a través de la membrana totalizó 5,9% de la enzima alimentada, y el resto de material de enzima alrededor del aparato era de 93,4% El material inorgánico presente en la solución difundida totalizó 37,0% del material inorgánico en el caldo de cultivo total alimentado. La potencia de la solución de enzima que no se difundió a través de la membrana era de 11,5 veces la potencia de la enzima en el caldo de cultivo original. La potencia fué determinada como unidades de coagulación de leche n.c.l. por un método deri-



vado del de C.A. Ernstrom, J. of Dairy Sciene, 41, 1664
(1.958). Este método es bien conocido para los técnicos en
la materia de determinar la concentración de preparados de
cuajo. La potencia final del fluido retenido era de 17,45
5 millones de unidades por litro.

Ejemplo II.- Se repitió el procedimiento del Ejem-
plo I excepto que se utilizaron 541 litros de caldo de cul-
tivo filtrado y clarificado en un margen de presión de 8,75
a 13,5 kg/cm² manométricos. La temperatura del depósito de
10 alimentación oscilaba entre 21,6 y 24,9 °C, y la velocidad
de difusión por todo el ensayo, que duró 8,0 horas, dismi-
nuyó desde 2800 ml/minuto hasta 670 ml/minuto, El volumen
de solución que se difundió a través de la membrana totali-
zó 497 litros y el volumen del caldo de cultivo que no se
15 difundió a través de la membrana totalizó 44,3 litros. La
enzima que pasó a través de la membrana totalizó 6,8% de
la enzima alimentada y el resto de material de enzima situa-
do alrededor del aparato era de 89,7%. El material inorgá-
nico presente en la solución difundida totalizó 83,5% del
20 material inorgánico en el caldo de cultivo total alimenta-
do. La potencia de la solución de enzima que no se difun-
dió a través de la membrana fué de 9,67 veces la potencia
de la enzima en el caldo de cultivo original. La potencia
final del fluido retenido era de 15,87 millones de unida-
25 des por litro.

Ejemplo III.- Se llevó a cabo el procedimiento
del Ejemplo I excepto que se utilizaron 1238 litros de cal-
do de cultivo filtrado. Este caldo de cultivo no fué clari-
ficado adicionalmente por utilización del auxiliar de fil-
30 tración de tierra de diatomeas. El margen de presión a lo



largo del experimento, que duró aproximadamente 28,0 horas, era de 8,4 a 18,9 Kg/cm² manométricos y la temperatura del depósito de alimentación osciló entre 22,0 a 23,5°C. La velocidad de difusión durante el experimento osciló entre 2200 ml/minuto y 370 ml/minuto. El volumen de solución que se difundió a través de la membrana totalizó 1156 litros y el volumen del caldo de cultivo que no se difundió a través de la membrana totalizó 81,8 litros. La enzima que pasó a través de la membrana totalizó 2,1% de la enzima alimentada y el resto de material de enzima alrededor del aparato era de 84,4%. El material inorgánico presente en la solución difundida totalizó 86,4% del material inorgánico en el caldo de cultivo total alimentado. La potencia de la solución de enzima que no se difundió a través de la membrana fué 12,15 veces la potencia de la enzima en el caldo de cultivo original. La potencia final del líquido retenido era de 24,74 millones de unidades por litro.

Ejemplo IV.— Una solución de la enzima proteolítica producida por Bacillus subtilis fué preparada disolviendo 5,0 de una mezcla que contiene la enzima y 34,3% de sólidos inorgánicos (la mayor parte de las veces sulfato de sodio) en suficiente cantidad de agua destilada para dar 510 ml de solución. La mezcla de la enzima y de sólidos inorgánicos fué suministrada por la Royal Netherlands Fermentation Industries Ltd de Delft, Holanda, en forma de su producto de enzima proteolítica (utilizando como un aditivo para compuestos de lavado) denominado Mexatase (marca comercial registrada).

La actividad de proteasa de la solución de enzima inicial y de las otras soluciones producidas en los proce-

5

10

15

20

25

30

23.12.68



dimientos de este ejemplo fué determinada por el método que se da a continuación. Este método, que fué suministrado por la Royal Netherlands Fermentation Industries Limited, fué utilizado para determinar la actividad de proteasa en términos de Unidades Delft (UD).

En el método de análisis utilizado, se dejó que la enzima actuase sobre una solución caseína durante un periodo de tiempo específico bajo condiciones que simulan las que prevalecen en un procedimiento de lavado previo (para fines detergentes domésticos) utilizando agua dura sintética y en la presencia de tripolifosfato de sodio. La reacción fué interrumpida por la precipitación de la caseína intacta remanente utilizando una solución de ácido tricloroacético. El precipitado fué eliminado y se determinó el cambio de densidad óptica, con relación a una muestra testigo en la que no había tenido lugar proteólisis. El cambio de densidad óptica, que era debido a la presencia en la solución de fracciones de proteína con aminoácidos que contienen un nucleo aromático, es una medida de la actividad de enzima. Se dice que existe una actividad de proteasa de 1000 UD por gramo cuando un ml de una solución al 2% de un preparado de enzima muestra un cambio de densidad óptica de 0,400, bajo las condiciones antes indicadas (solución de caseína agua dura sintética, presencia de tripolifosfato de sodio).

El procedimiento detallado utilizado fue el siguiente:

(1) Se prepararon los siguientes reaccionantes:

Reaccionante 1.- Una solución de 130 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada para formar 3000 ml.



Reaccionante 2.- Una solución de 42 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en agua destilada para formar 3000 ml.

Reaccionante 3.- Una solución de 53 g de Na_2CO_3 en agua destilada para formar 3000 ml.

5 Reaccionante 4.- Un agua corriente dura sintética preparada mezclando, en el orden dado, con agitación constante, 100 ml de cada uno de los reaccionantes 1, 2 y 3 y 9700 ml de agua destilada.

10 Reaccionante 5.- Una solución de 36,34 g de tris (hidroximetil) aminometano disuelto en el reaccionante 4 para formar 1000 ml.

15 Reaccionante 6.- Se añaden 1000 de tripolifosfato de sodio, lentamente y con agitación constante a 40,5 litros de agua destilada. A continuación, se añaden, en el siguiente orden, 500 ml de reaccionante 1, 500 ml de reaccionante 3, con agitación constante. Después que fueren disueltos los sólidos, el pH de la solución de fué ajustado a 8,5 utilizando HCl al 10%. Se dejó sedimentar el contenido de la solución y la solución fué filtrada hasta quedar
20 transparente.

Reaccionante 7.- Una solución de 540 g de ácido tricloroacético en agua destilada hasta 3000 ml. 10 ml de esta solución pueden ser neutralizados por 21,9 ml de NaOH 0,5 N, utilizando fenolftaleína en calidad de indicador.

25 Reaccionante 8.- Una solución de 900 g de acetato de sodio ($3H_2O$) en agua destilada hasta 3000 ml. La densidad de esta solución era de 1,1 a 20°C.

30 Reaccionante 9.- Una solución de 900 ml de ácido acético con agua destilada para dar 3000 ml. 2 ml podían ser neutralizados por 20,75 ml de NaOH 0,5 N utilizando

POOR QUALITY



fenolftaleína en calidad de indicador.

5 Reaccionante 10.- Una solución de 2,5 ml de Tween 80 (una mezcla compleja de polioxietilen éteres de ésteres oleícos parciales mixtos de anhídridos de sorbitol, también conocida como polioxietilen (20)monoleato de sorbitano y como Polysorbate 80. El tween 80 es una marca comercial registrada de la Atlas Powder Company, Wilmington Delaware) en agua destilada hasta 50 ml, agitada antes de utilizarse cada vez.

10 Reaccionante 11.- Se mezcló lo siguiente, en el orden dado, con agua destilada para formar 1000 ml:

100 ml de cada uno de los reaccionantes 7, 8 y 9 y 4 ml del reaccionante 10.

15 Reaccionante 12.- El sustrato de caseína fue preparado añadiendo 2,5 litros de reaccionante 4 con agitación a 36,0 g de caseína. Acto seguido, la mezcla fue agitada durante 10 minutos y se añadieron 300 ml de reaccionante 5 y la mezcla fue agitada durante otros 10 minutos. El recipiente con esta mezcla fue agitado en un baño de agua a 70°C hasta que la temperatura de la solución era de 40°C, temperatura a la cual el pH de la solución fue ajustado a 8,5 utilizando NaOH 1,0 N. La solución fue enfriada hasta la temperatura ambiente y fue diluída hasta 20 3,0 litros con reaccionante 4. Este reaccionante (reaccionante 12) fue preparado recientemente cada día y el sustrato de caseína, que había de ser utilizado posteriormente en el curso del día, fue almacenado bajo refrigeración hasta que se le necesitaba.

25 (2) La muestra de enzima que había de ser analizada (sólido o solución) fue preparada disolviendo el 30



sólido o diluyendo la solución en una cantidad de reaccio-
nante 6, siendo la cantidad tal que la solución contenía
entre 20 y 30 UD de proteasa por ml. El pH de la solución
fué ajustado a 8,5 utilizando NaOH, 1,0 N. o HCl 1,0 N. Es-
ta solución fué preparada siempre en el espacio de 2 horas
antes de la utilización. La solución de enzima, una canti-
dad del sustrato de caseína (reaccionante 12) y dos tubos
para centrífugar fueron calentados a 40°C en un baño de
agua a 40°C $\pm 0,1^\circ\text{C}$. 1 ml de solución de enzima fué intro-
ducido con pipeta en un tubo para centrífuga, se introdu-
jeron con pipeta 5 ml de solución de sustrato en el tubo
en el momento cero y los contenidos de los tubos fueron
mezclados agitando y fueron incubados exactamente durante
40 minutos. Al final de este período, 5 ml de reaccionan-
te 11 fueron introducidos con pipeta en el tubo y fueron
mezclados por turbulencia. El tubo fué colocado en el ba-
ño de agua durante otros 30 minutos para permitir la coa-
gulación del precipitado y después fué centrifugado duran-
te 15 minutos.

(3) Se realizó un ensayo de control para cada
solución de enzima analizada introduciendo con pipeta 5
ml de reaccionante 11 en un tubo para centrífuga y añadien-
do 1 ml de solución de enzima y 5 ml del reaccionante 12
al tubo para centrífuga, con turbulencia, después de que
los 5 ml iniciales de reaccionante 11 hubieron llegado a
40°C. El tubo y su contenido para el ensayo de control
fueron colocados en el baño de agua durante 30 minutos y
después fueron centrifugados durante 15 minutos,

(4). Las densidades ópticas de la solución de
enzima y de la solución de control fueron determinadas en



un espectrofotómetro de ultravioleta con relación a agua destilada a 275 m μ . La diferencia de densidad óptica (muestra de ensayo menos muestra de control) era de 0,4-0,5. Cuando la diferencia de densidad óptica era demasiado alta o demasiado baja, se repetía el ensayo ajustando correspondientemente la dilución inicial de la solución de enzima.

(5) La diferencia de densidad óptica era la densidad óptica de la muestra de ensayo menos la de la muestra de control. El número de Unidades Delft de actividad de proteasa en la muestra se obtuvo comparando la diferencia de densidad óptica para la muestra con una curva patrón de diferencia de densidad óptica en función de la actividad de proteasa. La curva patrón se obtuvo cada día realizando el ensayo, tal como se bosqueja anteriormente, sobre 4 a 6 muestras preparadas a partir del preparado de enzima original Maxatase (marca comercial registrada). El fabricante declaró que el preparado de enzima original tenía una actividad de proteasa de 300.000 unidades Delft por gramo. Se prepararon soluciones con diferentes diluciones a partir de una cantidad pesada del preparado de enzima original y después fueron analizadas para obtener la curva patrón.

400 ml de la solución de enzima fueron colocados en la cuba de una Cuba de Ultrafiltración Diaflo (marca comercial registrada) modelo 400, fabricada por la Amicon Corp. de Lexington, Massachusetts. Esta solución de alimentación poseía un color ámbar claro, tenía un pH de 7,7, tenía un contenido total de sólidos de 9,15 mg/ml, mostraba una actividad de proteasa de 2400 unidades Delft/ml, y



una concentración de material inorgánico disuelto de 3,14 mg/ul.

La Celda de Ultrafiltración modelo 400 fué utilizada para evaluar las características de una Membrana de Ultrafiltración Diaflo XM-50, producida también por la Amicon Corporation. La cuba, propiamente dicha, consiste en un tubo cilíndrico hueco, montado con su eje vertical, en cuya parte superior se fijó una tapa de cierre que llevaba una válvula de reducción de presión y una conexión con un manantial o recipiente de puesta a presión. El fondo del tubo cilíndrico estaba cerrado por la membrana en ensayo, que estaba soportada sobre una placa de soporte porosa. El soporte poroso, a su vez, estaba soportado sobre un conjunto de fondo, que consistía en una cubeta colectora para los fluidos que pasaban a través de las membranas, y que también llevaba un orificio de salida. La presión fué creada poniendo a presión la cuba utilizando nitrógeno aplicado a través del dispositivo conectado con la tapa de cierre de la cuba. El líquido que estaba contenido en la cuba de ultrafiltración (el cilindro hueco) y que estaba en contacto con la membrana, fué mezclado por un dispositivo de agitación magnética que era parte de la cuba de ultrafiltración. El líquido difundido fué eliminado continuamente, a la presión ambiente, a través del orificio de salida conectado con la cubeta colectora que soportaba la membrana en el fondo del cilindro de extremos abiertos (cuba). El concentrado o líquido retenido fué decantado de la cuba al final del experimento. Todas las partes metálicas internas de la cuba están recubiertas con Teflon (marca comercial registrada) y la cámara de la cuba



cilíndrica estaba fabricada de un plástico de policarbonato. El diámetro de la membrana circular expuesta a la solución de enzima era de 75 mm.

5 La cuba de ultrafiltración fué hecha funcionar. bajo una presión de 3,5 kg/cm² manométricos a una temperatura de 30 a 33,2°C durante 250 minutos. Se obtuvo una solución difundida, de color amarillo dorado, por un total de 358 ml. El producto difundido manifestó un pH de 7,6, una concentración total de sólidos de 7,05 mg/ml, y una actividad de proteasa de 300 unidades Delft/ml. El concentrado o solución retenida totalizó 25 ml, manifestó un pH de 7,4, una concentración total de sólidos de 38,6 mg/ml, y una actividad de proteasa de 23.800 unidades Delft. (U.D)/ml. El concentrado era de color pardo oscuro y contenía algo de material sólido visible. El contenido total de sólidos del concentrado se determinó que era 33% de material inorgánico. La cuba fué lavada, y los 25 ml de agua de lavado, de color amarillo claro, con pH 7,6, contenían 1,75 mg/ml de total de sólidos y tenían una actividad de proteasa de 400 U.D/ml. El resto de material de enzimas alrededor de la cuba de ultrafiltración era de 74,5%.

10

15

20

La utilidad del procedimiento de ósmosis inversa fué mostrada por el hecho de que el material retenido contenía 595.000 U.D. ó 62,0% de la enzima alimentada en solamente 6,25% del volumen de líquido alimentado. La aptitud de la membrana de ósmosis inversa para purificar la enzima está mostrada por el hecho de que los sólidos contenidos en el material retenido manifestaron una actividad total de proteasa de 615.000 U.D. por gramo, comparado con la actividad total de proteasa del preparado de enzima original

25

30



(mostrado por el análisis de la solución de alimentación) de 262.000 U.D/g. Además, la cantidad de material inorgánico asociado con la enzima se calculó que era de 1,31 g/millón de U.D. en la solución de enzima de alimentación original mientras que el material inorgánico asociado con el material en el producto retenido se calculó que era solamente de 0,54 g/millón de U.D.

El fabricante declaraba que la membrana XM-50 retenía solutos con un peso molecular superior a 50.000. Se logra una purificación comparable a una presión de alimentación de 2,10 kg/cm² manométricos, empleando la misma enzima de B. subtilis. antes cargada.

Ejemplo V.- La cuba de ultrafiltración Modelo 400 fué cargada con 300 ml del producto difundido del Ejemplo IV y se siguió a continuación el procedimiento del ejemplo IV. La membrana utilizada era una de tipo U.M.-1 fabricada por la Amicon Corporation. Se utilizó el mismo diámetro de membrana que en el Ejemplo IV. El fabricante declaraba que la membrana tipo UM-1 retiene solutos con pesos moleculares superiores a 10.000. La solución de alimentación tenía un pH de 7,6, tenía un contenido total de sólidos de 7,05 mg/ml, y tenía una actividad de proteasa de 300 Unidades Delft/ml.

La cuba de ultrafiltración fué hecha funcionar, bajo una presión de 6,58 a 7 kg/cm² manométricos, a una temperatura de 27,8°C a 29,0°C, durante 103 minutos. Se obtuvo una solución difundida, de color amarillo pálido, que totalizaba 272 ml. El producto difundido manifestó un pH de 7,0, y una actividad de proteasa menor de 25 Unidades Delft/ml. El concentrado o solución retenida totalizó 24 ml,



5 manifestó una concentración total de sólidos de 33,9 mg/ml, y una actividad de proteasa de 3500 Unidades Delft (UD)/ml. El concentrado era de color ambar claro. El contenido total de sólidos del concentrado se determinó que contenía 34% de material inorgánico. La cuba fué lavada y los 25 ml de agua de lavado incolora, de pH 7,2, manifestaron una actividad de proteasa menor de 25 U.D./ml. El resto de material de enzima alrededor de la cuba de ultrafiltración era de 93,1%.

10 El material retenido contenía 84.000 UD en total, lo cual representa 93,1% de la actividad de la solución alimentada originalmente a la cuba. Esta actividad de enzima en el producto retenido estaba contenida en un volumen que representaba solamente 3,0% del volumen líquido inicial alimentado a la cuba. Los sólidos contenidos en el producto retenido manifestaron una actividad de proteasa total de 103.000 UD por gramo, comparado con la actividad de proteasa total en la solución de alimentación de 44.000 UD por gramo. Se logra una purificación comparable con este equipo y procedimiento, empleando la solución impura de E. parasitica cargada en el Ejemplo I, con presiones de alimentación de 2,1 a 7 kg/cm².

25 Ejemplo VI.- La cuba de ultrafiltración modelo 400 utilizado en el Ejemplo IV fué cargada con 200 ml de una solución de 3,0 g de Maxatase (marca comercial registrada) en 300 ml de agua. La Maxatase utilizada era el mismo preparado de enzima descrito en el ejemplo IV y contenía 34,3% de material inorgánico. Antes de cargar en la cuba, la solución fué filtrada a través de un auxiliar de filtración de tierra de diatomeas (Super-Cel). A conti-



nuación se siguieron los procedimientos del Ejemplo IV. La membrana utilizada era una de tipo UM-2 fabricado por la Amicon Corporation. Se utilizó el mismo diámetro de membrana que en el Ejemplo IV. El fabricante declara que la membrana tipo UM-2 retiene solutos con pesos moleculares superiores a 1000. La solución de alimentación de color ámbar claro, tenía un pH de 7,9, tenía un contenido total de sólidos de 8,92 mg/ml y tenía una actividad de proteasa de 2500 unidades Delft/ml.

La cuba de ultrafiltración fué hecha funcionar, bajo una presión de 6,79 a 6,36 kg/cm² manométricos, a una temperatura de 29,8°C a 30,2°C, durante 129 minutos. Se obtuvo una solución difundida incolora, que totalizó 150 ml. El producto difundido manifestó un pH de 6,9 y una actividad de proteasa menor de 25 Unidades Delft/ml. El concentrado o solución retenida totalizó 47,5 ml, manifestó una concentración total de sólidos de 25,2 mg/ml, y una actividad de proteasa de 11.700 unidades Delft (UD)/ml. El concentrado, que manifestó un pH de 5,6, era de color pardo oscuro y se podía ver en él algo de material sólido. El contenido total de sólidos del concentrado se determinó que contenía 35% de material inorgánico. La cuba fué lavada y los 25 ml de agua de lavado incolora, de pH 7,1, manifestaron una actividad de proteasa menor de 25 UD/ml. El resto de material de enzima alrededor de la cuba de ultrafiltración era de 111,0%.

El material retenido contenía 555.000 UD ó 11,0% de la enzima cargada en la cuba en solamente 23,7% del volumen de líquido alimentado. El material retenido manifestó una actividad total de proteasa de 463.000 UD de enzima original (por análisis de la alimentación) de 200.000

UD



UD por gramo. La cantidad de material inorgánico asociado con la enzima en la solución de alimentación original se calculó que era de 1,31 g/millón de UD, mientras que el material inorgánico asociado con el material en el producto retenido se calculó que era de 0,75 g por millón de UD.

5

Ejemplo VII.- La Cuba de Ultrafiltración Modelo 400, utilizada en el Ejemplo IV, fué cargada con 250 ml de una solución de enzima preparada de una manera sustancialmente idéntica a la utilizada para preparar la solución inicial del Ejemplo VI. La solución fué filtrada también de la manera utilizada con la solución inicial para el ejemplo VI. La membrana utilizada era una membrana de acetato de celulosa Tipo MF-10 suministrada por Desalination Systems, Inc, de Escondido, California. Se utilizó el mismo diámetro de membrana que se utilizó en el Ejemplo IV.

10

15

A continuación se siguieron los procedimientos del Ejemplo IV. La solución de alimentación tenía un pH de 7,7, tenía un contenido total de sólidos de 0,92 mg/ml y tenía una actividad de proteasa de 2350 Unidades Delft/ml.

20

La cuba de ultrafiltración fué hecha funcionar, bajo una presión de 6,65 a 6,86 kg/cm² manométricos a una temperatura de 29,5°C a 33,8°C, durante 29 horas. Se obtuvo una solución difundida que totalizaba 126 ml. El producto difundido manifestó un pH de 6,6 y una actividad de proteasa de 25 Unidades Delft/ml. El concentrado o solución retenida totalizó 107 ml, manifestó una concentración total de sólidos de 17,64 mg/ml, y una actividad de proteasa

25

de 5300 Unidades Delft (UD)/ml. El concentrado manifestó un pH de 5,2. El contenido total de sólidos del concentrado se determinó que contenía 66% de material inorgánico.

30



La cuba fué lavada y los 24,5 ml de agua de lavado, de pH 6,4, manifestaron una actividad de proteasa de 160 UD/ml. El resto de material de enzima alrededor de la cuba de ultrafiltración era de 97,0%.

5 El material retenido contenía 567.000 UD ó 96,8% de la enzima cargada en la cuba en 42,8% del volumen de líquido alimentado. El material retenido manifestó una actividad de proteasa total de 303.000 UD por g, comparada con la actividad de proteasa total de la solución de enzima original (por análisis de la alimentación) de 263.000 UD por g. El material inorgánico asociado con el material en el producto retenido se calculó que era de 2,18 g por millón de UD.

10

Ejemplo VIII.- Como en el Ejemplo I, se produjo un caldo de cultivo que contenía enzima proteolítica coaguladora de la leche por fermentación de E. parasitica de acuerdo con la patente USA 3.275.453. Después de filtración, 420 litros de este caldo de cultivo fueron recirculados, a una presión de entrada de 24,5 a 25,2 kg/cm², en la unidad de ósmosis inversa de Havens descrita en el Ejemplo I, y empleando la membrana de acetato de celulosa de este ejemplo. Esta vez, sin embargo, se emplearon solamente dos módulos de 7 tubos cada uno en serie, para proporcionar un área de superficie de membrana de aproximadamente 1,2 m². El caldo de cultivo de alimentación tenía una potencia de 2100 unidades de coagulación de la leche por ml y contenía 2,32 g de total de sólidos por ml, equivalentes a una potencia de sólidos de 90.800 unidades de coagulación de leche por gramo. Después de 30 horas, se

15

20

25

30

recogieron 13 litros de fluido retenido, que tenían una



potencia de 60.270 u.c.l/ml y una concentración total de sólidos de 15,61 g/100 ml, equivalentes a 336.100 ucl/g y que representa una recuperación de 88,8% de la actividad introducida.

5

El primer concentrado fué diluído de nuevo con agua hasta 99 litros y fué sometido a una segunda concentración en la unidad de ósmosis inversa a 24,5 kg/cm². El producto retenido final tenía un volumen de 17 litros, una potencia de 43.705 ucl/ml, y una concentración total de sólidos de 8,56 g/100 ml, equivalente a 510.000 ucl/g y una recuperación global de 84,5% de la actividad en el caldo de cultivo filtrado original.

10

15

El concentrado de dos pasadas fué filtrado en filtro Sparkler y la torta fué lavada con agua, para rendir un concentrado final que contenía 37.367 ucl/ml y 6,88 g/100 ml total de sólidos, equivalentes a 542.000 ucl/g.

20

25

Una porción de este concentrado fué secada por pulverización para formar un polvo libremente fluente, no higroscópico de color tostado, en un secador por Pulverización de Laboratorio Bowen que tenía una cámara de secado de 750 mm de diámetro y 750 mm de altura, con atomización por un disco giratorio (a 40.00 rpm), con un caudal medio de 70 ml por minuto y una temperatura del aire de entrada de 160°C. Una alimentación de 1416 ml de concentrado líquido rindió 86 g de polvo seco que tenía una potencia de 425.000 ucl/g, correspondiente a una recuperación de actividad 78,4% con relación a la etapa de secado, basado en la potencia de sólidos.

30

Un segundo caldo de cultivo de fermentación de E. parasitica fué filtrado, evaporado, bajo vacío a 25-35°C



y fué filtrado en filtro Sparkler para rendir un concentrado que contenía 14.800 ucl/ml y 0,2958 g/ml de total de sólidos, que correspondía a 50.000 ucl por gramo. La recuperación de actividad con relación a la etapa de concentración fué de 83,5%. Tres porciones de 1 litro de este concentrado son secadas para formar polvos higroscópicos de color amarillo pálido en el Secador por Pulverización Bowen anterior, con los siguientes resultados:

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Temperatura de entrada, °C	163	177	191
Peso del producto, g	101	131	136
Análisis del producto, ucl/g	5970	4870	912
Rendimiento, %, basado en potencia de sólidos.	11,9	9,7	1,8

Ejemplo IX.- Una solución acuosa de la enzima proteolítica producida por B. subtilis con un análisis de 15600 Unidades Delft por ml tal como se describe en el Ejemplo IV, 31,94 mg/ml de total de sólidos y 9,86 mg/ml de cenizas sulfatadas, fué dividida en tres porciones:

La porción A fué evaporada a aproximadamente una quinta parte del volumen a 25-30°C bajo vacío, para rendir un concentrado que tenía una potencia de 80.000 Unidades Delft por ml y que contenía 157,11 mg/ml de total de sólidos.

La porción B fué concentrada aproximadamente 10 veces por ósmosis inversa tal como se describe en el Ejem-



plo I, empleando la membrana y el aparato de este ejemplo y haciendo circular a aproximadamente $17,5 \text{ kg/cm}^2$, para rendir un concentrado que tenía una potencia de 93,740 unidades Delft por ml y que contenía 87,37 mg/ml de total de sólidos.

5

La porción C representa parte del concentrado de la porción B, diluida a la mitad de la concentración con agua y concentrada de nuevo en la unidad de ósmosis inversa como anteriormente, para rendir un concentrado que tenía una potencia de 163.700 Unidades Delft por ml y que contenía 93,51 mg/ml de total de sólidos.

10

Porciones de 1 litro de cada uno de estos tres concentrados fueron secadas por pulverización para formar polvos con color desde amarillo claro a tostado claro en el Secador por Pulverización de Laboratorio Bowen descrito en el Ejemplo precedente, con un caudal medio de 50 ml por minuto y un caudal de aire de $6,3 \text{ m}^3$ por minuto (orificios cerrados) con los siguientes resultados.

15

20

25

30

24.12.68



	Experi- mento	Alimen- tación	Tempera- tura de secado de entrada, °C.	Producto secado		
				peso, g	% de vo- latiles	UD/mg % de ren- dimiento (b)
5	1	A	149°C	-(a)	-	-
	2	A	163°C	-(a)	-	-
	3	A	177°C	10	-	6, 2
	4	B	146°C	81	16,00	925, 102, 2
	5	B	162°C	85	13,27	760, 81, 5
10	6	B	172°C	80	12,64	360, 38, 4
	7	C	149,5°C	91	8,81	1480, 92, 5
	8	C	162°C	90	6,84	1473, 90, 2
	9	C	178°C	83	7,15	1419, 87, 3

15 (a) No hay sólidos recuperables en los experimentos 1 y 2.
 (b) Calculado como la proporción de la potencia de sólidos del producto (corregido en cuanto a compuestos volátiles) a la potencia de sólidos de la alimentación, por ejemplo para el experimento 5.

20
$$760 \times \frac{100}{100-13,27} \times \frac{87,37}{93,740} \times 100 = 81,5\%$$

25 Ejemplo X.-Este experimento se condujo con el sistema de ósmosis inversa suministrado por American Standard Inc. de New Brunswick, Nueva Jersey. Consistía en dos módulos TL-5-14, provistos cada uno con 14 tubos de resina epoxídica reforzados con fibra de vidrio de una longitud de aproximadamente 1,5 m y un diámetro interior de 13 mm, revestidos con un total de aproximadamente 1,64 m² de membrana de acetato de celulosa, caracterizada por un grado

30



de rechazo de sal de 2 a 3%. Este es un sistema de una única pasada sin recirculación. Se introdujo enzima proteolítica de B. subtilis acuosa como en el Ejemplo IX a 70 kg/cm² y se llevaron a cabo tres pasadas adicionales a la misma presión, siendo la carga para cada una de las últimas pasadas el producto retenido o concentrado procedente de la pasada inmediatamente precedente. Los resultados fueron los siguientes:

10	Potencia UD/ml	Total de sólidos % en peso (volumen/	Cenizas sulfatadas, % peso/volumen	Azúcares reductores % en peso/volumen
Pasada I	Alimentación 14.800	4,89	1,27	0,756
	Difundido 0	1,72	0,58	0,356
	Concentrado 28.200	7,63	1,57	1,10
Pasada II	Difundido 200	3,12	1,00	0,53
	Concentrado 49.000	11,34	2,25	1,64
Pasada III	Difundido 0	3,10	1,24	0,62
	Concentrado 69.000	16,5	2,77	2,075
Pasada IV	Difundido 900	3,84	1,17	0,77
	Concentrado 98.000	20,3	2,80	2,5

La pureza fué aumentada de esta manera desde 303 a 483 UD/mg, con pérdida despreciable del producto difundido. Se puede lograr por ejemplo una purificación comparable a una presión de alimentación de 52,5 kg/cm² así como con la alimentación de B. parasitica del Ejemplo I.



Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 6 de noviembre de 1.967 con el número 680.756 y 21 de Octubre de 1.968 nº se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

10

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:

15

1.- Un procedimiento para purificar y concentrar la enzima de coagulación de la leche, suavemente proteolítica, que es producida por *Endothia parasitica*, o la enzima proteolítica que es producida por *Bacillus subtilis*, caracterizado por exponer una solución de la enzima contaminada a una cara de una membrana semipermeable, a través de la cual no pasarán cantidades sustanciales de la enzima y a través de la cual pasarán cantidades sustanciales de disolvente, sales inorgánicas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, estando dicha solución de enzima bajo una presión suficiente para hacer que el disolvente fluya desde la solución a través de dicha membrana, con lo cual la enzima es retenida por la membrana y no lo son el disolvente, las sales inorgánicas y los compuestos orgánicos.

20

25

30

2.- El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la solución de enzima es

24.12.68



una solución acuosa y la membrana semipermeable consiste esencialmente en acetato de celulosa.

5 3.- El procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que la enzima es la enzima proteolítica producida por *Bacillus subtilis* y la presión es de 7 a 52,5 kg/cm².

10 4.- El procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que la solución de enzima es una solución acuosa y la membrana semipermeable es una membrana permeable al agua de alto flujo con bajas propiedades de retención de cloruro sódico.

15 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por exponer una solución acuosa de la enzima coaguladora de la leche que es producida por *Endothia parasitica*, bajo una presión de 2,1 a 70 kg/cm², a una membrana semipermeable que consiste esencialmente en acetato de celulosa, a través de la cual no pasará la enzima y pasarán agua, sales inorgánicas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, con lo cual, el agua las sales inorgánicas y los compuestos orgánicos de bajo peso molecular son dejados pasar a través de la membrana semipermeable y no es dejada pasar la enzima.

20 6.- El procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que la presión es de 7 a 52,5 kg/cm².

30 7.- El procedimiento según las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado por el hecho de que es realizado a una temperatura comprendida entre la que es justamente mayor que el punto de congelación de la solución y la temperatura justamente inferior a aquella a la cual tiene lugar degra-



ción térmica sustancial de la enzima.

5 8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, para purificar y concentrar la enzima proteolítica que es producida por el Bacillus subtilis, caracterizada por exponer una solución acuosa de la enzima contaminada, bajo una presión de 2,1 a 70 kg/cm², a una membrana semipermeable del tipo complejo de polielectrolito que contiene grupos aniónicos de poliestireno sulfonato y grupos cationicos de polivinilbenciltrimetil amonio, a través de la cual no pasará la enzima y pasarán agua, sales inorgánicas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, con lo cual el agua, las sales inorgánicas y los compuestos orgánicos de bajo peso molecular son dejados pasar a través de la membrana semipermeable y no lo es la enzima.

10 9.- El procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por el hecho de que la presión es de 7 a 52,5 kg/cm².

15 10.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que la solución de enzima concentrada retenida por dicha membrana, es secada por pulverización a elevada temperatura.

20 11.- Un procedimiento para purificar y concentrar la enzima de coagulación de la leche.

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

30

24.12.68



Esta Memoria consta de cuarenta y siete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 2 ENE 1969

P.A.

Alfonso de Elzab
Por Todo
Alfonso

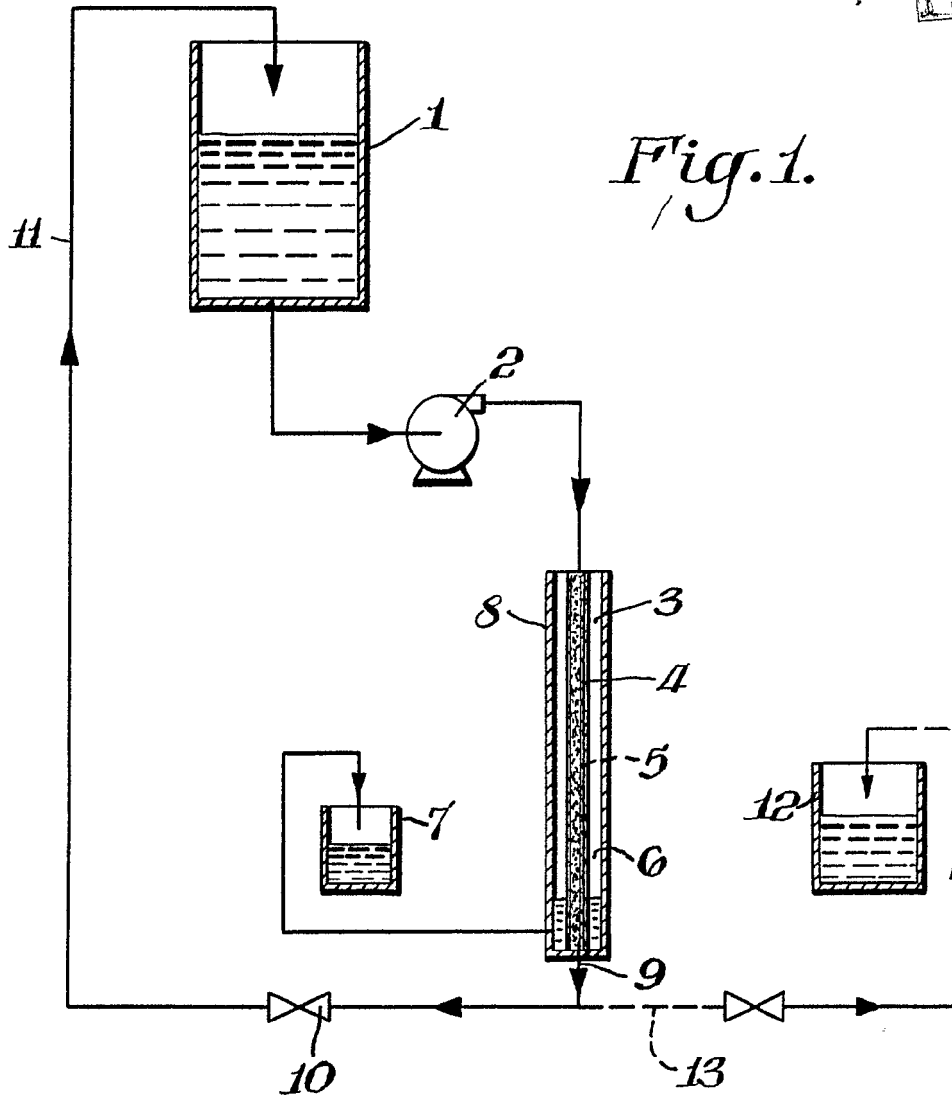
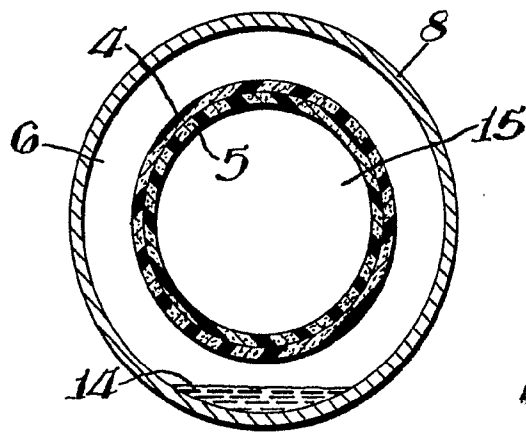


Fig. 1.

Fig. 2.



Alfonso de Velasco
Madrid