

363379

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
CLASE C-12 C-14  
SUBCLASE D D

Memoria descriptiva



17 MAR. 1969

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad / ~~de nacionalidad~~ japonesa

con domicilio en 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka,  
Japón

por: "UN METODO PARA PRODUCIR UNA PROTEASA ALCALINA" (Clase Internacional C07g C12d). -



La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una nueva proteasa alcalina, así como a detergentes y otros agentes de limpieza que contienen la enzima.

5           En el curso de sus estudios para obtener proteasas alcalinas, los solicitantes de la presente invención han encontrado que ciertos microorganismos pertenecientes al género Fusarium o al género Gibberella producen una proteasa alcalina, que muestra una potente actividad proteolítica a pH de alrededor de 11.

10           Además, se comprobó que la proteasa citada degrada activamente varias clases de proteínas en un intervalo muy amplio de pH, incluso en presencia de agentes tensoactivos y/o agentes formadores de quelatos, lo que sugería su posibilidad de aplicación en el campo de

15           la industria de detergentes.

          Hasta ahora, aunque han sido aplicadas ciertas enzimas a los procedimientos de lavado, no se han conseguido siempre resultados satisfactorios. Una de las posibles causas de ello es que la disolución de lavado se encuentra casi siempre a pH superior a 8. Otra causa es que la actividad enzimática es inhibida a veces por los

20           agentes tensioactivos y/o los formadores de quelatos contenidos en los detergentes.

25           A este respecto, se han efectuado también estudios amplios, y se ha establecido finalmente un procedimiento para producir una potente proteasa alcalina a escala comercial, y se han fabricado detergentes y otros agentes de lavado que contienen la enzima. En adelante,

30           la enzima será denominada simplemente "proteasa alcalina".

5.6.70.



Por lo tanto, el objeto principal de la presente invención es proporcionar una proteasa alcalina que muestra una potente actividad en el intervalo de pH de 8,0 a 12,0, y particularmente 10,0 a 11,5.

5 Otro objeto es proporcionar detergentes y --- otros agentes limpiadores que contienen la proteasa alcalina.

10 Con el fin de alcanzar los objetos citados de la presente invención, en un medio de cultivo es cultivada una cepa de microorganismos productores de proteasa alcalina, pertenecientes al género Fusarium o al género Gibberella. Algunos microorganismos típicos que -- producen la proteasa alcalina son los siguientes:

	<u>Fusarium oxysporum</u>	(IFO 5942)
15	<u>Fusarium oxysporum</u> fam. <u>batatas</u>	(IFO 4468)
	<u>Fusarium oxysporum</u> fam. <u>gladioli</u>	(IFO 5894)
	<u>Fusarium oxysporum</u> fam. <u>lini</u>	(IFO 5880)
	<u>Fusarium oxysporum</u> fam. <u>neveum</u>	(IFO 4471)
	<u>Fusarium oxysporum</u> fam. <u>lini vasinfectum</u>	(IFO 4472)
20	<u>Fusarium solani</u>	(IFO 5232)
	<u>Fusarium</u> , esp. S-19-5	(IFO 8884)
	<u>Gibberella fujikuroi</u>	(IFO 5268)
	<u>Gibberella saubinetii</u>	(IFO 6608)

25 La expresión IFO y los números, entre paréntesis, son los números de registro en el Instituto de -- Fermentación, Osaka, Japón.

30 Entre estos microorganismos, el Fusarium, esp. S-19-5, es una de las cepas más útiles para la producción de la proteasa alcalina. Esta cepa fue aislada a -- partir de una muestra de tierra por los solicitantes de



la Patente de la presente invención, y tiene las siguientes características microbiológicas:

(1) Características de cultivo (24°C, 7 días)

1. Caldo de malta:

5 Buen desarrollo, blanco; se forma película flocculante; reverso rugoso; pigmento escarlata-púrpura en el medio.

2. Agar de malta:

10 Buen desarrollo, blanco y flocculante; hifas aéreas abundantes; reverso rugoso; un pigmento escarlata-púrpura en el medio.

3. Disolución de Czapek:

15 Buen desarrollo, blanco; se forma película flocculante; reverso rugoso; ningún pigmento sustancialmente.

4. Agar de Czapek:

Buen desarrollo, blanco y flocculante; reverso rugoso; sustancialmente ningún pigmento.

5. Gelatina:

20 Buen desarrollo, blanco y flocculante; pigmento --púrpura negruzco oscuro en el reverso; licuefacción débil.

6. Dextrosa de patata:

25 Buen desarrollo, blanco y flocculante; superficie desigual, levantada; reverso rugoso, de blanco a púrpura claro; pigmento púrpura dejado en libertad en el medio.

(2) Características microscópicas.

30 En cada uno de los medios anteriores se desarrollan conidióforos a partir de las hifas aéreas, no -



1711

ramificados, de 10 a 60 micras de longitud y 1,0 a 1,5 micras de anchura, hialinos. Se producen conidios en el vértice sobre los conidióforos, y se agrupan en un racimo mucilaginoso, oval o de forma de riñón; una a dos células, y raramente tres células, de 5 a 8 por 1 a 2 micras, hialinos. No se forma estado sexual. Usualmente no hay clamidospora, pero a veces está presente.

(3) Características fisiológicas.

1. Condiciones para el desarrollo:

10 Concentración de iones hidrógeno: se desarrollan preferiblemente en medios alcalinos, óptimamente a pH entre 8,0 y 9,0. Temperatura: óptima, 24°C aproximadamente. Posible el desarrollo entre 15°C y 28°C, aunque se observa mejor desarrollo a 15°C que a 28°C. Requerimiento de oxígeno: aerobios.

2. Gelatina: licuefacción:

Ligera.

3. Utilización de alcohol etílico:

Negativa.

20 4. Degradación de pectina:

Muy ligera.

5. Degradación de tanino:

Negativa.

6. Degradación de grasas y aceites:

25 Positiva.

7. Utilización de hidratos de carbono:

Utiliza maltosa, galactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, fructosa, manosa, rafinosa, dextrina, almidón, glucosa y lactosa. Utiliza ligeramente inulina, xilosa, arabinosa y celulosa.

30

17 MAR.



Según el "Diccionario de los Hongos" (G.C. -- Ainsworth, 5ª edición), las características microbianas citadas indican que esta cepa particular pertenece al género Fusarium, familia Tuberculariáceas, orden Moniliales, subclase Deutermicetos, clase Fungi Imperfecti.

Según la clasificación de Snyder y Hansou, los Fusarium están divididos, como sigue, en las Secciones A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>:

A<sub>1</sub>: se forman microconidios, usualmente de -- una célula.

A<sub>2</sub>: no se forman microconidios o se producen raramente, con forma de huso, de coma o de riñón, de una a varias células.

El organismo, Fusarium, esp. S-19-5, produce predominantemente microconidios, y puede ser incluido en el grupo Elegans de la Sección A. El grupo Elegans -- está ilustrado por el Fusarium oxysporum, e incluye 36 especies, todas las cuales son plantas patógenas que -- producen macroconidios en abundancia.

El organismo Fusarium esp. S-19-5, no obstante, produce sólo microconidios en la mayoría de los casos, y la formación de macroconidios es muy rara. Esta característica indica que el organismo no puede ser incluido en ninguna de las especies hasta ahora conocidas de este grupo.

Para cultivar un microorganismo productor de proteasa alcalina, pueden utilizarse medios y condiciones de cultivo convencionales per se.

El medio puede emplearse, bien en forma de líquido o de sólido. El cultivo puede ser efectuado en --

17 MAR



condiciones estacionarias; sin embargo es más ventajoso adoptar métodos de cultivo con agitación o medios de cultivo aerobios.

5 Siempre que pueda desarrollarse sobre él un microorganismo productos de proteasa alcalina, el medio puede ser de cualquier tipo. Puede contener, por ejemplo, como fuentes de carbono, materiales tales como glucosa, sacarosa, dextrina, almidón, celulosa, glicerina, sorbitol, y similares, y, como fuentes de nitrógeno, materia-  
10 les tales como peptona, extracto de carne, extracto de levadura, levadura seca, harina de soja, pan de soja, -- salvado de trigo, salvado de arroz, extracto de patata, caseína, gluten hidrolizado de caseína, líquido de maceración de maíz, urea, sales de amonio, nitratos y otros  
15 compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos. Como sa- les inorgánicas, pueden ser incorporados varios fosfatos, sulfatos y clorhidratos, por ejemplo. En ciertas circuns- tancias pueden ser añadidas, con el fin de estimular el desarrollo de los microorganismos, varias vitaminas, ami-  
20 no-ácidos, ácidos nucleicos y sus compuestos análogos, - etc. Según los métodos de cultivo y las condiciones a em- plear, la adición de un agente antiespumante natural o - sintético, por ej. aceite de soja o aceite de silicona, puede ser efectiva para una mayor acumulación de la enzi-  
25 ma.

Al cultivar los microorganismos, es preferible preparar un cultivo previo a menor escala, que, a su vez, es inoculado en el medio de cultivo principal.

30 Las condiciones de cultivo, tales como la -- temperatura y tiempo de incubación, pH del medio, veloci-

11.3.69



dad de aireación, etc., han de variar con los microorganismos y las composiciones del medio a emplear.

La condición necesaria es que las condiciones sean seleccionadas y controladas de modo que sea máxima la acumulación de la proteasa alcalina. En muchos casos, las condiciones preferidas incluyen una temperatura de incubación de desde 20° a 30°C, un tiempo de incubación de 2 a 7 días, un pH del medio próximo a 7, y una velocidad de aireación de 0,5 a 1,5 litros por minuto por litro del medio.

Así pues, el microorganismo acumula gran cantidad de la proteasa alcalina en el cultivo.

Cuando se emplea un medio líquido, la enzima objeto de la invención aparece en su mayor parte en la fase líquida del cultivo. Por tanto, es preferible seguir las operaciones de separar los micelios por filtración o centrifugación, y a continuación recuperar y aislar la enzima del líquido de filtración, o del fluido que sobrenada, según el caso.

Cuando se emplea un medio sólido, usualmente es preferible someter a extracción el cultivo de antemano con agua o una disolución acuosa de una sal inorgánica, y después recuperar la enzima a partir del extracto resultante.

Para recuperar y aislar la enzima a partir del cultivo de filtración, del cultivo que sobrenada o del extracto del cultivo, puede emplearse cualquiera de los medios de aislamiento y purificación convencionales per se. Estos incluyen separar la enzima por salificación con una sal inorgánica, tal como el sulfato de sodio, -



sulfato de amonio o cloruro de sodio, precipitación fraccionada de la enzima añadiendo un disolvente orgánico hidrófilo adecuado, tal como metanol, etanol o acetona. - Además, una disolución de enzima puede ser concentrada bajo presión reducida y/o desmineralizada por diálisis. Es posible también emplear medios tales como la adsorción y desorción sobre gel de fosfato de calcio, alúmina, bentonita, resina cambiadora de iones, etc.; cromatografía empleando un derivado de celulosa, por ej. dietil aminoetil celulosa, filtración por gel, precipitación, - electrodiálisis, electroforesis, y separación de impurezas en forma de un complejo de metales pesados.

La proteasa alcalina producida y preparada de la manera anterior es activa en el amplio intervalo de pH de entre 8,0 y 12,0, y particularmente en la zona de pH de 10,0 a 11,5.

La temperatura óptima para la actividad de la enzima se encuentra más o menos entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 60°C, y particularmente entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C. Estos intervalos de temperaturas de la actividad de la enzima concuerdan muy bien con las condiciones reales de lavado mecánico. Además, la actividad no es inhibida por los agentes tensioactivos y/o los agentes formadores de quelatos, que son ingredientes de los productos detergentes o limpiadores.

En esta invención, la proteasa alcalina puede ser empleada, no sólo en forma de una preparación altamente purificada, sino también en forma de producto crudo de enzima que es obtenido con la pureza deseada según



el fin perseguido; tanto una preparación pura como cruda de la enzima pueden ser utilizadas como ingrediente de los productos limpiadores o detergentes.

5 Como ejemplos de los agentes tensioactivos --  
contenidos en los productos detergentes pueden indicarse  
se varios compuestos, que incluyen los agentes tensioac-  
tivos aniónicos del tipo de sales de ácidos grasos, del  
tipo de sulfato o del tipo de sulfonato, tales como los  
jabones naturales de ácidos grasos (NS), alcohilsulfato  
10 (DAE), olefina-sulfato, n-alfa-olefina sulfonato (AOS),  
tetrapropilbenceno sulfonato (ABS), y n-alcoholbenceno  
sulfonato (LAS); y agentes tensioactivos no iónicos bien  
del tipo de éter o del tipo de éster, tales como los éte-  
res de polioxietileno y alcohol, los éteres de polioxi-  
15 etileno y alcoholfenol, los ésteres de alcohol polivalen-  
te y alcohol, los ésteres de polioxietileno alcohol,  
ésteres de azúcar, y similares.

Los productos detergentes o limpiadores pueden  
contener aditivos mejoradores de la detergencia, tales  
20 como tri-polifosfato, sulfatos, carbonatos, boratos, así  
como carboximetil celulosa, colorantes fluorescentes, -  
aromas, agentes blanqueantes, por ej. perboratos, agen-  
tes formadores de quelatos, por ej.  $N(CH_2COONa)_3$ , agen-  
tes protectores de la piel, por ej. óxido de dimetillau-  
25 rilamina, desinfectantes, por ej. aminas terciarias, etc.

La proteasa alcalina es mezclada con otros com-  
ponentes del producto, que pueden encontrarse en forma -  
polverulenta, granular o líquida, y, cuando la mezcla re-  
sultante es un líquido, puede ser secada hasta obtener -  
30 un producto pulverulento o granular por procedimientos -



convencionales, tales como el secado por pulverización.

Como no existe ningún sistema internacional de unidades para esta clase de enzima, es difícil prescribir la proporción de enzima en los productos detergentes o limpiadores en general.

En la presente invención, la actividad de la proteasa alcalina es determinada por el siguiente método de Kunitz modificado (J. Gen. Physiol., 30, 291, 1947) 1,0 ml. de una disolución acuosa de caseína al 2% (de Hammarstein) y 0,5 ml. de tampón 0,1 M de glicina-NaOH, de pH 11,0, son mezclados con 0,5 ml. de una disolución de enzima, 2,0 ml. de la mezcla resultante se dejan incubar a 37°C durante 20 minutos, y después la reacción es detenida por adición de 3,0 ml. de una disolución acuosa al 5% de ácido tricloroacético. La mezcla se deja reposar a 37°C durante otros 30 minutos, con lo que la caseína no digerida es precipitada completamente. La caseína precipitada es separada por filtración, y el líquido de filtración resultante es sometido a una determinación de densidad óptica a 275 milimicras, a partir de la cual es calculada la proporción de caseína digerida, en forma de la proporción de tirosina. Una unidad de la actividad de proteasa (UP) se define como la cantidad de enzima que disuelve la cantidad de caseína equivalente a 1,0 microgramo de tirosina por minuto, en las condiciones de ensayo. La actividad específica de una muestra de enzima es expresada en UP/mg.

La proporción de proteasa alcalina que ha de ser incorporada en los productos detergentes ha de variar con el tipo de producto. En el caso de un detergen-



te para lavar telas, la proporción preferida puede variar en general entre 5 y 10.000, en unidades por gramo del detergente, y en la práctica de 10 a 5.000 unidades por gramo.

5 Un detergente que contiene proteasa alcalina -  
preparado de la manera anterior muestra una acción limpia-  
dora notablemente intensa frente a las manchas proteíni-  
cas atribuibles al sudor, a sangre, caldo y leche, que -  
son difíciles de eliminar por lavado con un detergente -  
10 convencional.

Además, el detergente es empleado en el pre-la-  
vado, así como en el lavado principal.

En el prelavado, los materiales manchados son -  
usualmente empapados en una disolución de detergente a -  
15 temperatura ambiente durante varias horas, mientras que  
el lavado principal es llevado a cabo preferiblemente a  
una temperatura más elevada, de entre 40°C y 60°C, duran-  
te una hora aproximadamente.

En los ejemplos siguientes se muestran realiza-  
20 ciones preferidas de la invención, pero no han de ser con-  
siderados como limitativos de la presente invención.

A lo largo de toda la memoria descriptiva, las  
abreviaturas "ml", "mg", " $\mu$ g", " $\mu$ ", "m $\mu$ " y °C signifi-  
25 can mililitros), miligramo(s), microgramo(s), micra(s),  
milimicra(s) y grados centígrados, respectivamente. Los -  
tantos por ciento están calculados en peso por volumen. -  
En los ejemplos que siguen, las partes en peso están re--  
lacionadas con las partes en volumen de igual manera que  
los gramos con los mililitros. En los dibujos, E represen-  
30 ta energía,  $\lambda$  longitud de onda, N número de onda,  $\tau$  trans



mitancia, Ar actividad relativa, t temperatura y Ad actividad residual.

Ejemplo 1

5 500 partes en volumen de un medio líquido, compuesto de 5% de harina de soja desgrasada, 5% de glucosa, 2% de fosfato de dihidrógeno y sodio, y con pH ajustado a 7, son introducidas en un fermentador (cuya capacidad es de 2000 partes en volumen esterilizadas, inoculadas con Fusarium, esp. S-19-5 (IFO 8884) e incubadas a 28°C durante 5 días, bajo aireación y agitación, para preparar un cultivo de siembra.

15 El cultivo de siembra es inoculado a un fermentador (cuya capacidad es de 50.000 partes en volumen) -- que contiene 30.000 partes en volumen del mismo medio líquido anterior, y el fermentador es sometido a incubación a 25°C durante 144 horas, con una velocidad de aireación de 45.000 partes en volumen por minuto, con agitación a 500 rev./minuto. Durante la incubación, la formación de espuma es inhibida por adición de una proporción adecuada de aceite de soja de vez en cuando.

20 La variación en el valor del pH y en la actividad de proteasa en el curso del cultivo son las siguientes:

25 Tiempo de cultivo (horas) 0; 18; 30; 42; 54; 66; 78; 90; 122; 144

pH del cultivo 7,30; 6,40; 6,30; 6,12; 6,35; 6,72; 7,30; 7,09; 7,50; 7,50

Actividad de enzima (UP/ml) - 67 141 1430 2250 2270 2520 2520 2760 2540



### Ejemplo 2

El cultivo obtenido después de 144 horas, según el Ejemplo 1, es enfriado hasta aproximadamente 5°C, y después es hecho pasar a través de un filtroprensa con el auxiliar de filtración Hyflo Super-Cel (Johns-Manville Products Corp., EE.UU.), con lo que los micelios son separados. A las 20.000 partes en volumen de filtrado resultantes se añade sulfato de amonio 0,6-saturado, y el precipitado separado por salificación es recogido por filtración con el auxiliar de filtración. El precipitado resultante de sulfato de amonio que contiene el auxiliar de filtración es disuelto en aproximadamente 6.000 partes en volumen de agua fría, y los materiales insolubles son separados por filtración. Después es añadido al filtrado sulfato de amonio 0,6-saturado, para precipitar la enzima de nuevo, y ésta, a su vez, es recogida por centrifugación, disuelta en 1.000 partes en volumen de agua fría, dializada frente a agua fría por medio de un diafragma de piel de pez durante 4 días, y liofilizada, dando un polvo de enzima cruda. Por el procedimiento anterior se obtienen 30 partes en peso de polvo de la enzima cruda, con un color parduzco. La actividad específica de esta muestra es de aproximadamente 980 UP/mg.

### Ejemplo 3

En 3.000 partes en volumen de agua fría son disueltas 30 partes en peso del polvo de enzima cruda preparado en el Ejemplo 2, y los materiales insolubles de la disolución de enzima son separados por filtración

17 MAR



5 con el auxiliar de filtración, obteniéndose una disolu-  
ción transparente. Es añadido sulfato de amonio 0,6-sa-  
turado al líquido de filtración transparente, dando un -  
precipitado de la enzima, que después es disuelto de --  
nuevo en 1.500 partes en volumen de agua fría, decolora  
do con carbón vegetal, dializado frente a agua fría a -  
4°C-5°C durante 4 días, y liofilizado formando un polvo.  
Por el procedimiento anterior se obtienen 4,5 partes en  
10 peso de un polvo de enzima parcialmente purificado, con  
una actividad específica de 1580 UP/mg.

15 4,5 partes en peso del polvo de enzima, disuel-  
tas en 450 partes en volumen de tampón de Tris-ClH 0,01  
M, de pH 9,0 son dializadas frente a tampón de Tris-ClH  
0,001 M, durante 3 días, colocadas en una columna de --  
diethylaminoetil celulosa equilibrada previamente con el  
tampón de Tris-ClH, y eluidas con el mismo tampón. Son  
recogidas aproximadamente 675 partes en volumen de la -  
fracción rica en enzima, son dializadas frente a agua -  
fría durante 3 días, y liofilizadas hasta formar un pol-  
20 vo. Por el procedimiento anterior se obtienen 0,35 par-  
tes de enzima purificada en estado pulverulento, con --  
una actividad específica de 5.400 UP/mg.

25 0,35 partes en peso del polvo de enzima purifi-  
ficada, disueltas en 335 partes en volumen de tampón de  
Tris-ClH 0,01 M, de pH 8,0, son cromatografiadas a tra-  
vés de una columna de Sephadex G-100, lavado previamen-  
te con el tampón de Tris-ClH. Son recogidas 62 partes -  
en volumen de la fracción activa, dializadas frente a -  
agua fría durante 3 días, y liofilizadas, con lo que se  
30 obtienen 0,15 partes en peso de un polvo de enzima alta-



mente purificada. La actividad específica de esta muestra es de 6.500 UP/mg.

Las características enzimológicas de esta muestra son las siguientes:

- 5 (1) Color y forma:  
Polvo blanco.
- (2) Análisis elemental típico (%):  
C, 46,72; H, 6,59; N, 15,03.
- (3) Constante de sedimentación ( $S_{20w}$ ):  
10 aproximadamente  $3,19 \times 10^{-13}$
- (4) Peso molecular (por el método de Archibald):  
 $2,65 \times 10^4 (\pm 5\%)$
- (5) Espectro de absorción ultravioleta (véase Figura 1):  
Absorción máxima a 275-280 milimicras;  $E_{280}^{1\%}$  milimicras, 1 cm. = 7,0  
15
- (6) Espectro de absorción infrarroja (véase Figura 2):  
Bandas de absorción significativa a 3,38, 6,05, 6,55, 6,88, 7,15, 8,12, 9,30 micras.
- (7) Punto isoeléctrico (por electroforesis de papel):  
20 A pH aproximadamente 11
- (8) Solubilidad:  
Soluble en agua y disoluciones acuosas de sales minerales con una intensidad iónica de 0,01 a 0,1 micras. Insoluble en metanol, etanol, acetona y éter etílico.  
25
- (9) Actividad de pH (véase figura 3):  
pH óptimo a aproximadamente 11.
- (10) Actividad de temperatura (véase figura 4):  
Temperatura óptima, aproximadamente 50°C.
- 30 (11) Estabilidad según pH (véase figura 5):



No hay desactivación en el intervalo de pH de 5 a 8; 10% de desactivación a pH 11,5 (1 hora de incubación a 37°C)

(12) Estabilidad en función de temperatura (véase figura 6):

No hay desactivación por debajo de 55°C; 20% de desactivación a 65°C, y 80% a 70°C (10 minutos de incubación a pH 5).

#### Ejemplo 4

Se examinó la influencia de varios agentes tensioactivos sobre la proteasa alcalina, con los siguientes resultados:

Según la fórmula dada en la Tabla 1 se preparan cinco detergentes diferentes, en los que se utilizan como tensioactivos la sal de sodio de ácidos grasos naturales de n-C<sub>15-18</sub> (NS), n-C<sub>12</sub>-alcohilsulfato de sodio (DAS), n-alfa-olefina de C<sub>15-18</sub> sulfonato de sodio (AOS), tetrapropilbencenosulfonato de sodio (ABS) y n-C<sub>12</sub>-alcohilbencenosulfonato de sodio, y estos detergentes resultantes son denominados NS-, DAS-, AOC-, ABS- y LAS-, respectivamente.

Tabla 1

Componente	Tanto por ciento
Agente tensioactivo	25
Trifosfato de sodio	40
Sulfato de sodio	29
Silicato de sodio	5
Carboximetilcelulosa	1



5 mg. de cada uno de los detergentes respectivos son disueltos en 2 ml. de una disolución de enzima - preparada disolviendo 2 mg. del polvo de enzima cruda obtenido en el Ejemplo 2 en 100 ml. de tampón de Tris-ClH  
 5 0,05 M, de pH 11,0, y es determinada la actividad de enzima de la disolución resultante, según el método de ensayo especificado. Los resultados se muestran en la Tabla 2, en la que se observa que ninguno de estos detergentes inhibe la actividad de la enzima.

10 Son preparados detergentes que contienen enzima mezclando 0,05 gr. del polvo de enzima cruda obtenido en el Ejemplo 2 con 100 g. de cada uno de los detergentes diferentes anteriores.

Tabla 2

15	<u>Tipo de detergente añadido</u>	<u>Actividad de proteasa (UP/ml.)</u>	<u>Actividad relativa *</u>
	Ninguno	19,6	100
	NS	20,0	102
	DAS	19,2	98
20	AOS	19,4	99
	ABS	19,2	98
	LAS	19,8	101

\* Actividad relativa  $\frac{(UP/ml \text{ con detergente})}{(UP/ml \text{ sin detergente})} \times 100$

25 La actividad limpiadora de estos detergentes que contienen enzima es comparada con la de los correspondientes detergentes desprovistos de enzima, en las condiciones del ensayo de lavado mecánico expuestas en la Tabla 3.

Tabla 3

5	Tela manchada ( 5 cm. x 10 cm.)	: Preparada por el método de la Japan Oil and Fat Chemical Association, - empleando una mezcla -- 1:1 de polvo de un fil- tro de aire y caseína, en lugar de negro de hu mo.
10	Disolución limpiadora	: 600 ml.
	Concentración de detergente	: 0,2%
	Temperatura de lavado	: 40°C
	Tiempo de lavado	: 30 minutos
	Tiempo de enjuagado (aclarado)	: 10 minutos

-----

15 La actividad limpiadora es evaluada por medio de un con-  
traste o comprobación por jurado. Al ensayo de cada uno  
de los detergentes se destinan cinco muestras de la tela  
manchada, y, después de la serie de operaciones de lava-  
do, aclarado y secado en las condiciones especificadas -  
20 en el ensayo de lavado mecánico, las telas lavadas resul-  
tantes son puntuadas por cinco jueces, según los siguien-  
tes patrones de puntuación:

- 25 +2 : La limpieza de la tela lavada con un detergen-  
te que contiene enzima es claramente superior  
a la lavada con el correspondiente detergente  
desprovisto de enzima.
- +1 : La limpieza de la tela lavada con un detergen-  
te que contiene enzima es ligeramente superior  
a la lavada con el detergente correspondiente



desprovisto de enzima:

0 : No se observa ninguna diferencia significativa de limpieza entre las dos telas comparadas.

5 Los resultados de la puntuación se muestran en la Tabla 4, en la que se presentan los efectos limpiadores relativos de los detergentes que contienen enzima -- frente a los detergentes correspondientes desprovistos -- de enzima, en lo que se refiere a los tipos respectivos de detergentes.

10

Tabla 4

Tipo de detergente	Puntuación de los jueces					Puntuaciones totales
	A	B	C	D	E	
NS	+2	+2	+2	+2	+2	+10
15 DAS	+2	+1	+2	+2	+2	+ 9
AOS	+1	+1	+1	+2	+1	+ 6
ABS	+2	+2	+1	+2	+2	+ 9
LAS	+2	+1	+1	+2	+2	+ 8

Ejemplo 6

20 De la misma manera que en el Ejemplo 1, son cultivados durante 6 días varios microorganismos pertenecientes al género Fusarium y al género Gibberella.

Los cultivos son después centrifugados, dando líquidos que sobrenadan que son empleados como disoluciones de enzimas. A 2.000 partes en volumen de cada una de las disoluciones de enzimas son añadidas 5 partes en peso de detergente LAS, descrito en el Ejemplo 4, y es determinada la actividad de proteasa de la disolución re--

25



5 resultante, por el método de ensayo especificado. Los resultados se exponen en la Tabla 5, e indican que el detergente LAS no inhibe actividad alguna de las enzimas producidas por los microorganismos productores de proteasa alcalina.

Tabla 5

Microorganismo	Actividad de enzima (UP/ml)	
	Con detergente	Sin detergente
<u>Fusarium oxysporum</u> (IFO 5942)	200,8	199,2
10 <u>Fusarium oxysporum</u> , fam. <u>lini</u> (IFO 5880)	550,5	553,8
<u>Fusarium oxysporum</u> , fam. <u>ni-</u> <u>veum</u> (IFO 4471)	315,8	307,2
<u>Fusarium solani</u> (IFO 5232)	230,2	235,0
<u>Gibberella fujikuroi</u> (IFO 5268)	73,2	75,6
15 <u>Gibberella saubinetti</u> (IFO 6608)	530,2	523,4

Ejemplo 7

Detergente líquido para uso en cocinas: En 55 partes en volumen de agua caliente a 60-65°C son disueltas 18 partes en peso de tetrapropilbencenosulfonato de sodio, 12 partes en peso de n-C<sub>12</sub>alcoholfenolétersulfato de sodio, 5 partes en peso de laurildietanolamida, y 10 partes en peso de xilenosulfonato de sodio. Una vez dejada enfriar, la disolución es suplementada con 0,5 -  
20 partes en peso del polvo de enzima cruda preparado en el  
25 Ejemplo 2, y una pequeña cantidad de un aroma, dando un detergente líquido para uso en cocinas.



### Ejemplo 8

5 Champú para el cabello: en 64 partes en peso -  
de agua caliente a 60-65°C son disueltas 5 partes en pe-  
so de lanolina acetilada, 6 partes en peso de Alkylolami-  
ne (American Alcolac Corp.) y 25 partes en peso de Dupo-  
nol XL (E.I. DuPont de Nemours Company). Después de de-  
jarla enfriar, la disolución es suplementada con 0,2 par-  
tes en peso del polvo de enzima cruda preparado en el --  
Ejemplo 2 y una pequeña cantidad de un aroma, para obte-  
10 ner un champú para el cabello.

### Ejemplo 9

15 1000 partes en volumen de un medio líquido, -  
compuesto de 10% de parafinas normales (C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>), 5% de  
harina de soja desgrasada, 0,05% de SO<sub>4</sub> Mg. 7H<sub>2</sub>O, 0,05%  
de Ca Cl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,05% de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3  
% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0% de agente tensioactivo y ajustado a -  
un pH de 7, se preparan en un fermentador (siendo su ca-  
pacidad 2000 partes en volumen), esterilizado, inocula-  
do con Fusarium sp. S-19-5 (IFO 8884) (ATCC 20192) e in-  
20 cubado a 24°C durante 6 días bajo aireación y agitación.

El filtrado del caldo de cultivo presenta 2100  
UP/ml de actividad de proteasa.

25 El caldo de cultivo obtenido anteriormente es  
sometido al tratamiento del ejemplo 2 para dar 1,0 g de  
un polvo de enzima crudo de 75 UP/mg de actividad espe-  
cífica.

Esta solicitud, que corresponde a las presen-  
tadas en Japón, con fecha 8 de Febrero de 1968, bajo el



número 7863/1968 y con fecha 15 de Marzo de 1968, bajo el número 16970/1968, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

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

10

1º. - Un método para producir una proteasa - alcalina, que comprende cultivar un microorganismo productor de proteasa alcalina perteneciente al género Fusarium o al género Gibberella, en un medio que contiene fuentes de carbono asimilable y fuentes de nitrógeno diferible, y en condiciones aerobias de cultivo, hasta -- que la proteasa alcalina es sustancialmente acumulada - en el cultivo, y recuperar a partir del mismo la protea sa alcalina acumulada.

15

20

2º. - Un método según la reivindicación 1, - en el que el microorganismo productor de la proteasa al calina pertenece al Fusarium oxysporum.

25

3º. - Un método según la reivindicación 1, - en el que el microorganismo productor de la proteasa al calina pertenece a la especie del Fusarium nov.

4º. - Un método según la reivindicación 1, - en el que el microorganismo productor de la proteasa al calina pertenece al Gibberella saubinetti.

5º. - Un método según la reivindicación 2, -

15 JUN



en el que el microorganismo productor de proteasa alcalina es el Fusarium oxysporum (IFO 5942).

5 6º.- Un método según la reivindicación 3, en el que el microorganismo productor de proteasa alcalina es el Fusarium, esp. S-19-5 (IFO 8884).

7º.- Un método según la reivindicación 4, en el que el microorganismo productor de proteasa alcalina es el Gibberella saubinetti (IFO 6608).

10 8º.- Un método según la reivindicación 1, en el que la temperatura de incubación se encuentra entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C.

9º.- Un método según la reivindicación 1, en el que el pH de incubación se encuentra entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9.

15 10º.- Un método para producir una proteasa alcalina.

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

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

Madrid, 15 JUN 1970

P. A.

Alberto de la Hoz  
*[Handwritten signature]*



17 MAR 1957

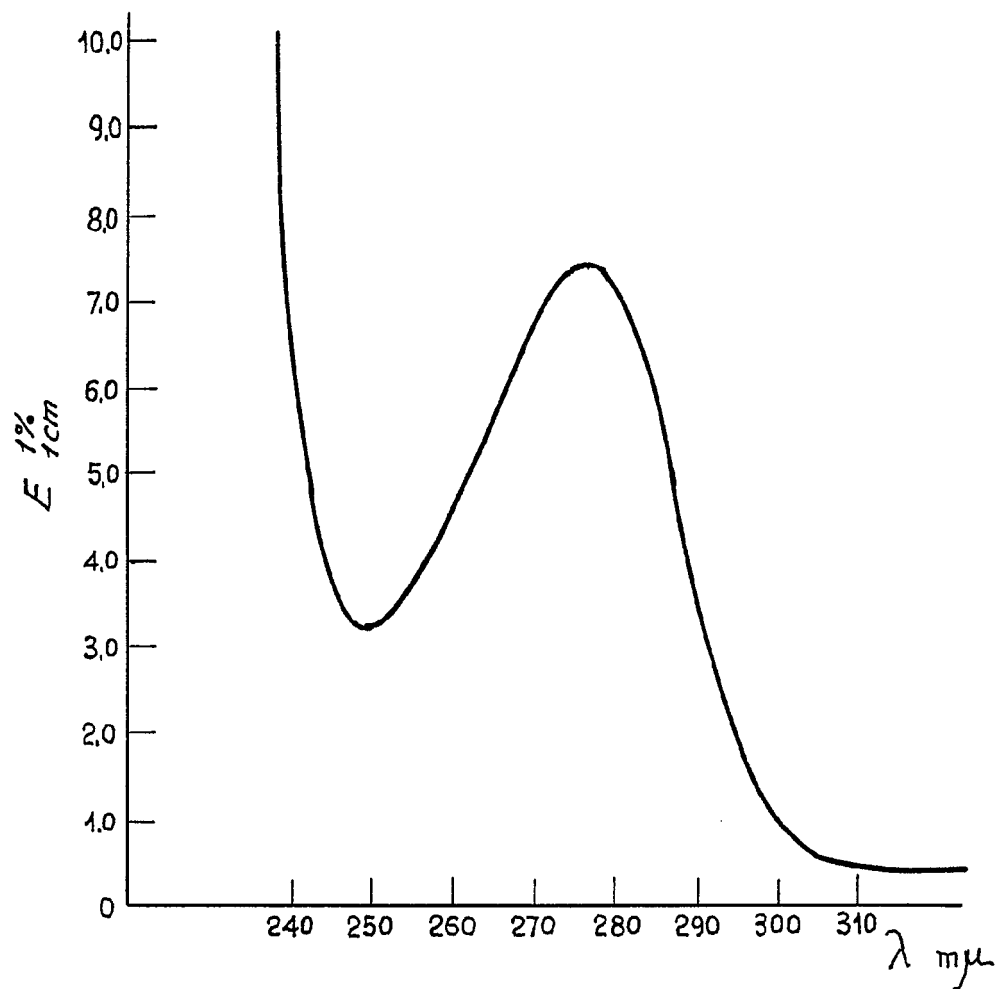


Fig: 1

ESCALA VARIABLE

Alberto de Elizaburu  
Por Poder

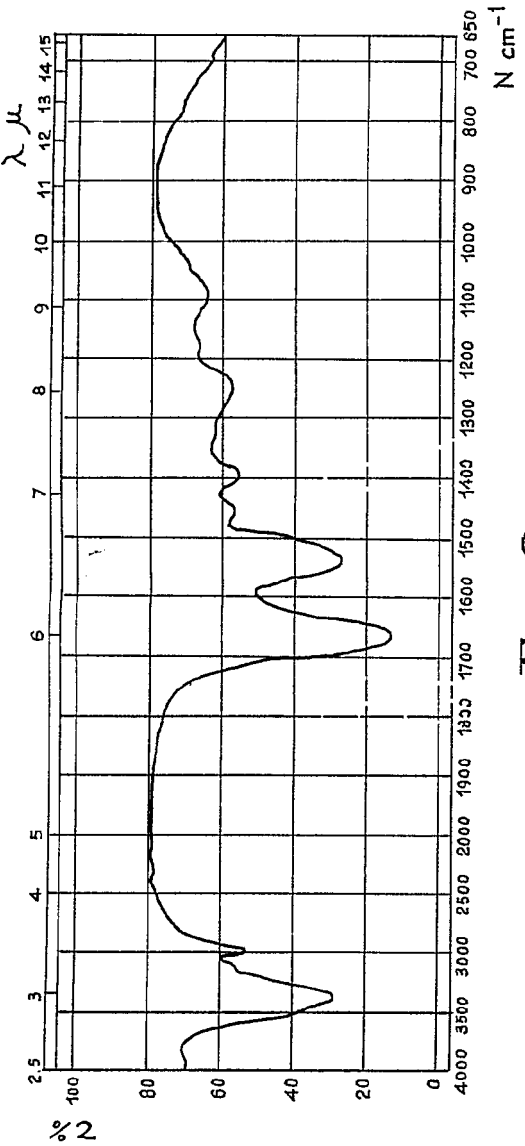


Fig: 2

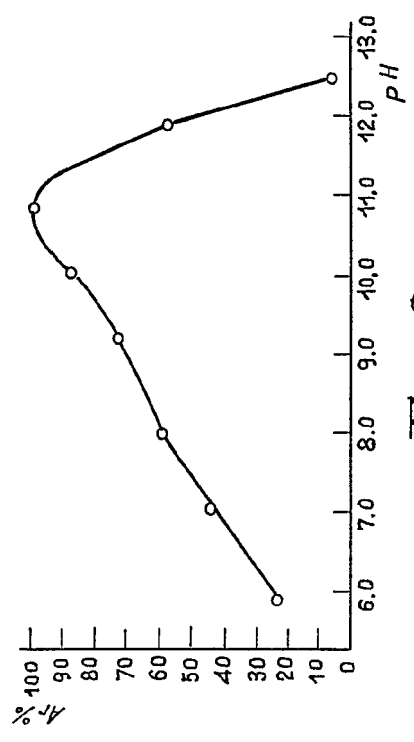


Fig: 3

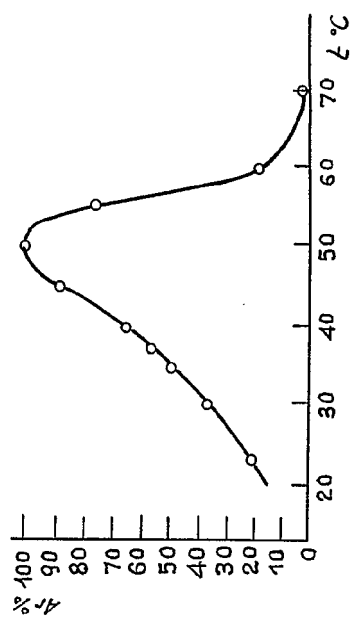


Fig: 4

all

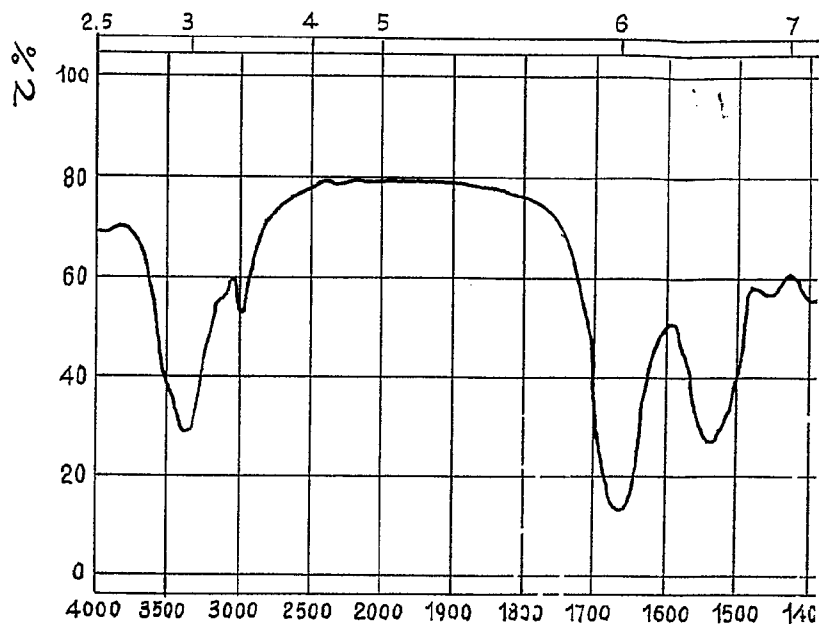


Fig: 2

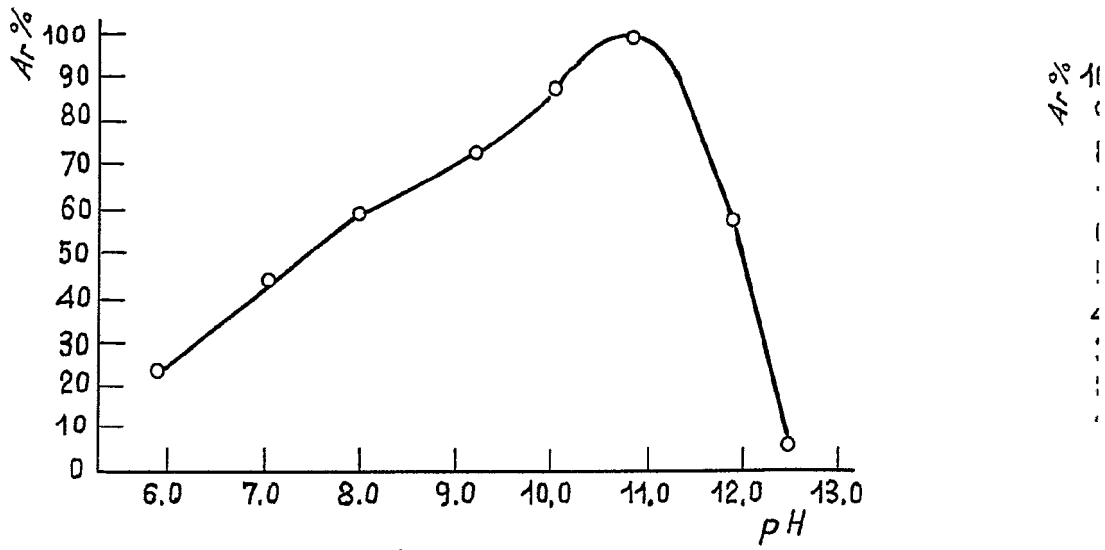
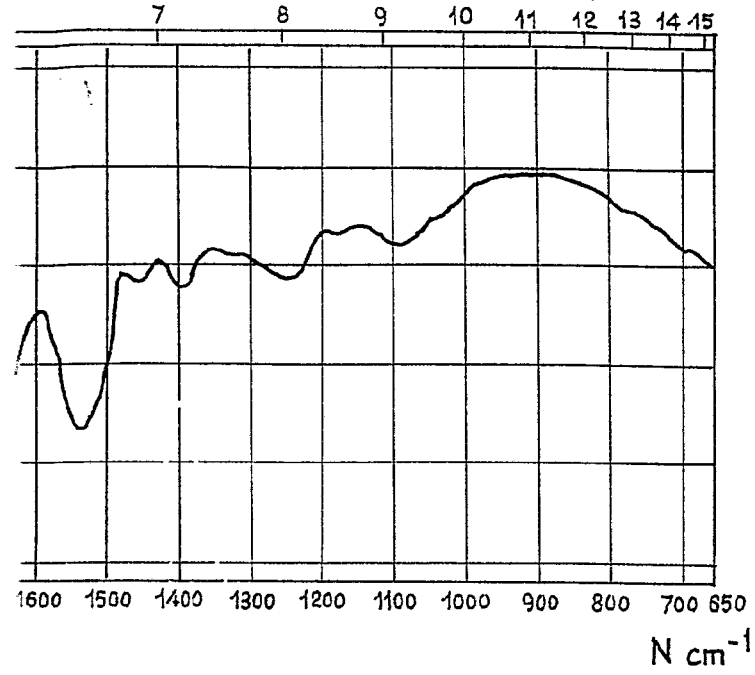


Fig: 3

ESCALA VARIABLE

$\lambda \mu$



no. 2

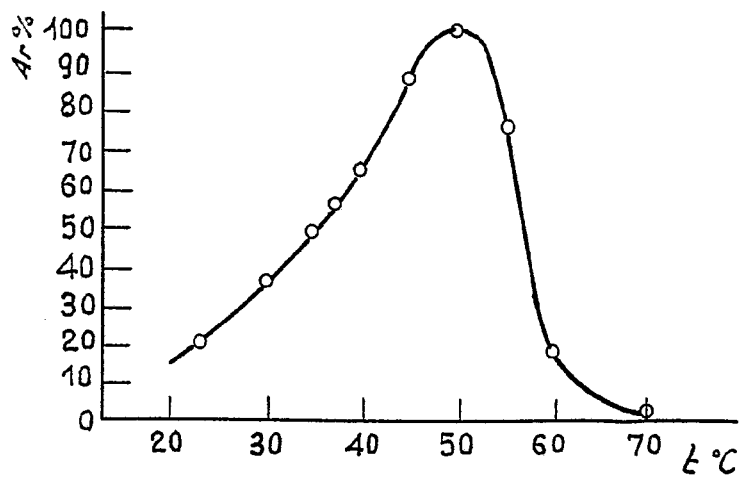


Fig: 4

*Handwritten signature or initials.*



Fig:5

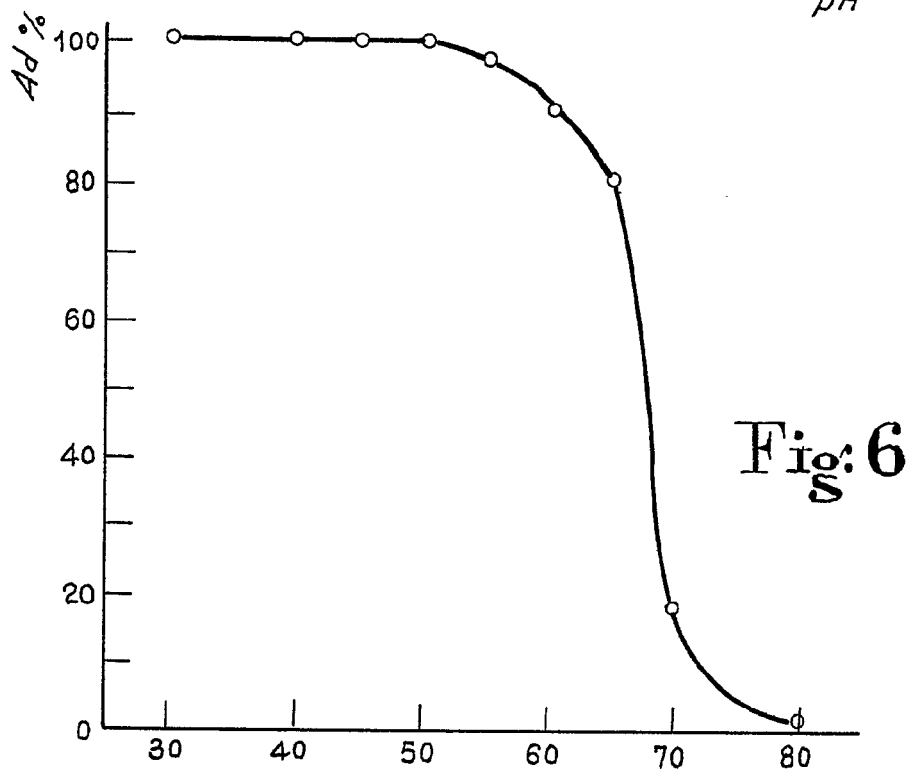
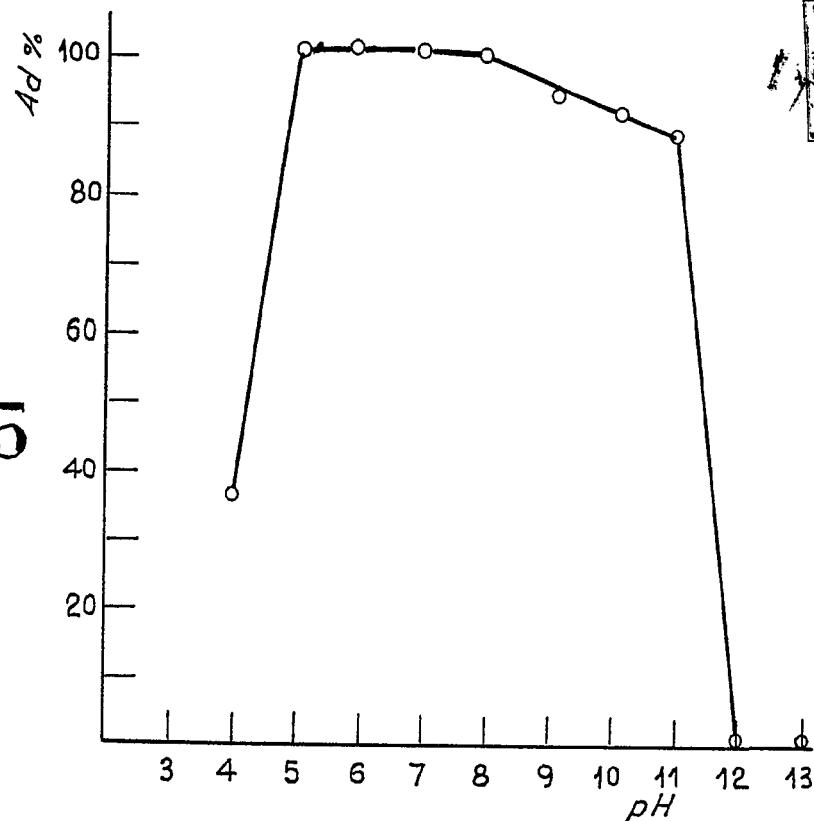


Fig:6

ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*