

374708

1901



PATENTE DE INVENCION

INSTRUCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE <u>C-11</u>
SUBCLASE <u>B</u>

Ref: P&G Case 1460.

374708

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para preparar composiciones enzimáticas acuosas estabilizadas.

=====

Solicitante: THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, entidad norteamericana, residente en 301 East Sixth Street, Cincinnati, Ohio 45202, EE.UU. de A.

=====

Este invento se relaciona con un procedimiento para preparar composiciones acuosas que contienen enzimas amilolíticas, útiles en la degradación de materias de almidón y que se caracterizan por su estabilización contra la pérdida de actividad amilolítica.

5.



- El uso de enzimas amilolíticas en la alteración y/o degradación de materias de almidón es una operación conocida. Por ejemplo, la patente Estadounidense 2.607.359 (19 de agosto de 1962) describe composiciones
5. que contienen una enzima amilolítica útil para facilitar la eliminación de materias porosas como son los papeles para empapelar paredes, etiquetas y pastas del tipo de la caseína de las superficies en las que se encuentran pegados los materiales porosos mediante un adhesivo que
 10. contiene almidón. De un modo similar, Jaag describe en Seifen, Ole, Fette, Wachse 88, N° 24, páginas 789-793, (noviembre de 1962), el uso de enzimas amilolíticas en formulaciones para el lavado de ropa. Estas enzimas ayudan en el proceso de lavado atacando la suciedad y las
 15. manchas de almidón que se encuentran en las telas sucias y descomponiéndolas y/o alterándolas para que se puedan eliminar con mayor facilidad durante el lavado. Las materias enzimáticas son productos costosos y poderosos que deben formularse y utilizarse juiciosamente. Estas enzi-
 20. mas, cuando se emplean en compuestos acuosos, son inestables y sufren una apreciable destrucción durante los periodos largos de almacenamiento, según se pone de evidencia por la pérdida sensible en su eficacia de degradación del almidón y/o eliminación de suciedad y manchas. La
 25. pérdida de actividad amilolítica es particularmente pronunciada en condiciones de alta temperatura. Además, las soluciones acuosas para el lavado de ropa que contienen enzimas amilolíticas, contienen frecuéntemente componentes adicionales convenientes para el proceso de lavado, pero
 30. que producen un efecto perjudicial en la enzima amilolíti



- ca. Las enzimas proteolíticas, por ejemplo, a pesar de ser útiles por sus propiedades de eliminación de suciedad y manchas proteínicas en los compuestos para el lavado de ropa, tienden con frecuencia a producir un efecto perjudicial de degradación en las enzimas amilolíticas.
- 5.

- Se han llevado a cabo intentos en la profesión para proporcionar composiciones con contenido enzimático amilolítico en los que se preservara la actividad enzimática por la incorporación de un agente estabilizador. Estos intentos han comprendido en general la incorporación en tales composiciones de sales de calcio hidrosolubles. Un boletín de la profesión, que describe amilasas bacterianas derivadas de *Bacillus subtilis*, publicado por Daiwa Kasei K.K. de Osaka, Japon, describe la estabilización de la amilasa bacteriana con iones cálcicos y sódicos. De un modo similar Hamada et al Agr. Biol. Chem. 31, Nº 1, páginas 1-6 (1967), describe el efecto estabilizador de los iones cálcicos sobre la α -amilasa. El empleo de sales cálcicas para impedir la pérdida de actividad amilolítica, particularmente a temperaturas elevadas, no ha resultado enteramente satisfactorio, en particular cuando se trata de periodos prolongados de almacenamiento a temperaturas elevadas. Por consiguiente, ha existido la necesidad de disponer de composiciones conteniendo enzimas amilolíticas que tuvieran una mayor estabilidad enzimática amilolítica.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

- Por consiguiente, este invento tiene por objeto proporcionar composiciones acuosas conteniendo enzimas amilolíticas estabilizadas que mantienen prácticamente su
- 30.



estabilidad amilolítica en almacenamiento.

5. Otro objeto de este invento es proporcionar composiciones acuosas conteniendo enzimas amilolíticas estabilizadas prácticamente contra la pérdida de actividad por la presencia de pequeñas cantidades de compuestos estabilizadores de las enzimas.

Otros objetos de este invento resultarán evidentes al estudiar el invento que se describe a continuación con mayor detalle.

10. Estos y otros objetos del presente invento se consiguen al proporcionar composiciones acuosas conteniendo enzimas amilolíticas que contienen pequeñas cantidades de ion calcio y ciertos agentes coestabilizadores orgánicos. Estas composiciones acuosas del presente invento pueden
15. contener adicionalmente componentes detergentes iniónicos o zwitteriónicos para aumentar la estabilidad de las enzimas amilolíticas en las composiciones acuosas de este invento y para aumentar las propiedades detergentes de estas composiciones. El presente invento se basa en parte en
20. el descubrimiento de que se pueden conseguir periodos prolongados de estabilización introduciendo en las composiciones acuosas con contenido enzimático una fuente de ion calcio y un compuesto orgánico elegido del grupo consistente en glicoles alifáticos y 1,3-propanodiol.

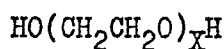
25. Las composiciones acuosas con contenido enzimático estabilizadas de este invento comprenden:

- (1) Aproximadamente de un 65 % a un 97 % de agua;
- (2) Aproximadamente de un 0,001 % a un 1 % de enzima amilolítica;
30. (3) Aproximadamente de un 0,001 % a un 1 %, con



relación al ion cálcico de una sal cálcica hidrosoluble estabilizadora de las enzimas;

5. (4) Aproximadamente de un 2 % a un 27 % de un compuesto orgánico elegido del grupo consistente en glicoles alifáticos que tiene la fórmula



en la que X es aproximadamente de 1 a 200; y 1,3-propanodiol; y

10. (5) De 0 a aproximadamente un 15 % de un detergente elegido del grupo consistente en detergentes iniónicos y detergentes zwitteriónicos.

Las enzimas amilolíticas que se pueden estabilizar en solución acuosa por la acción de la combinación descrita anteriormente de ion calcio y compuesto orgánico son

15. materias conocidas y pueden ser de origen fungal, vegetal, animal o bacteriano. Entre las enzimas amilolíticas apropiadas se encuentran las α -amilasas que son particularmente idóneas para descomponer moléculas de almidón puesto que atacan los enlaces $\alpha_{1,4}$ -glicosídicos en el almidón.

20. Las cadenas cortas degradadas se eliminan fácilmente de su medio ambiente con agua o soluciones acuosas de detergentes. Se citan como ejemplos de enzimas amilolíticas apropiadas las α -amilasas de origen mohoso, incluyendo aquellas derivadas del *Aspergillus niger*, *Aspergillus*

25. *alliaceus*, *Aspergillus wentii*, *Pencillium glaucum*. Las α -amilasas derivadas de gramos de cereales, fuentes pancreáticas y bacterias tales como el *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus thermophilus* son también útiles en el invento. Estas enzimas

30. son activas en la escala de pH de aproximadamente 4,5 a



aproximadamente 10 y a temperaturas de aproximadamente 15,5°C a 65,5°C. La actividad óptima de estas α -amilasas se produce generalmente en la gama de pH del orden 5,5 a 7,5 aproximadamente.

5. Las enzimas amilolíticas preferidas para el invento son las α -amilasas derivadas del organismo bacteriano Bacillus subtilis. Estas amilasas proporcionan excelentes propiedades desaprestantes y digestivas del almidón y son especialmente útiles en el lavado de géneros textiles que contienen suciedad y manchas de naturaleza del almidón.
10. Las enzimas amilolíticas útiles con el presente invento pueden emplearse en estado puro. En general se emplean en forma de un preparado en polvo disponible en mercado, en cuyo preparado se encuentra presente la enzima amilolítica en una cantidad de aproximadamente de un 2 % a un 80 % del preparado. La parte restante, v.g., aproximadamente un 20 % a un 98 %, comprende un vehículo inerte como es el sulfato de sodio, sulfato de calcio,
15. cloruro de sodio, arcilla u otros, Para preparar los compuestos acuosos estabilizados degradadores del almidón de este invento, se mezclan dichos preparados comerciales enzimáticos con agua y los componentes restantes de las composiciones. El contenido enzimático activo de estas composiciones enzimáticas comerciales es el resultado de
20. los métodos de manufactura empleados y no es un factor crítico para el invento en tanto que las composiciones acabadas de este invento tengan el contenido enzimático especificado más adelante. En general se separan los ma
25. teriales inertes insolubles de las composiciones de este
- 30.

- 7 - 374708



- invento para obtener composiciones acuosas que sean transparentes y estén prácticamente libres de depósitos precipitados. Se citan como ejemplos específicos de preparados enzimáticos comerciales apropiados para el
5. invento, y sus respectivos fabricantes: Diasmen α -amylase (Daiwa Kasei KK, Tokyo, Japan); Rapidase α -amylase THC-25 (Rapidase, Seclin, Francia); Novo bacterial α -amylase (Novo Industri, Copenague, Dinamarca); Wallerstein α -amylase (Wallerstein Company, Staten Island, Nueva York); Rhozyme-33 and Rhozyme H-39 (Rohm & Haas, Filadelfia, Pennsylvania).
- 10.

- El producto preferible para el invento es un preparado enzimático en polvo que contiene α -amilasa y una mezcla de proteasas alcalinas y neutras que se pueden obtener con la marca registrada CRD-Protease (o Monsanto DA-10) de la Monsanto Company, San Luis, Missouri. Esta composición contiene aproximadamente un 3 % de α -amilasa y es útil en el invento para dotar a las composiciones del mismo de actividad enzimática amilolítica y proteolítica. Son preferibles en el invento las mezclas de proteasas y α -amilasas y comprenden los preparados enzimáticos descritos en la patente Estadounidense 3.031.380 de Minagawa et al (24 de abril de 1962).
- 15.
- 20.

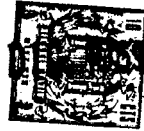
- La cantidad de enzima amilolítica empleada en las composiciones de este invento puede variar dependiendo de la actividad de la enzima o preparado enzimático, condiciones de pH y el uso final de las composiciones. Cuando las composiciones acuosas estabilizadas de este invento se emplean como eliminadores de manchas, deberán contener una cantidad de enzima amilolítica suficiente para elimi-
- 25.
- 30.



- nar las manchas y suciedades de almidón que normalmente se suelen encontrar en una situación de lavado de ropa. Normalmente las composiciones de este invento se preparan de forma que contengan aproximadamente de un 0,001 % a un 1 % de enzima, basado en el peso del compuesto acuoso, sobre una base de enzima pura. Para obtener los mejores resultados, es preferible que las composiciones contengan aproximadamente de un 0,1 % a 0,5 % de enzima amilolítica. Cuando se emplea un preparado enzimático en polvo comercial como fuente de enzima amilolítica, las composiciones de este invento contienen aproximadamente de un 0,1 % a un 4,0 % del preparado en polvo que contiene enzima amilolítica según se obtiene en forma comercial, v.g., conteniendo aproximadamente de un 2 % a un 80 % de enzima activa. Se observará que cuando dichos preparados se emplean con el invento, la cantidad del preparado necesaria para proporcionar compuestos acuosos que tengan los niveles deseados de actividad amilolítica, dependerá del nivel de actividad del preparado con contenido enzimático que se emplee. Las cantidades precisas de dichos materiales empleados pueden ^{fácilmente} determinarse/emplean do métodos conocidos en la profesión, en tanto que las composiciones estabilizadas del invento proporcionen una cantidad de actividad enzimática amilolítica suficiente para proporcionar los niveles deseados de propiedades degradantes del almidón.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.

Según se emplea en la presente memoria, la actividad amilolítica se refiere a la tendencia que tiene una enzima amilolítica para llevar a cabo la función deseada de alteración catalítica y/o degradación de materias de

- 30.



374708

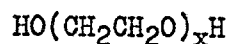
- almidón. La estabilidad, según se emplea el término en la presente memoria, se refiere a la tendencia que tiene una enzima amilolítica para retener su actividad enzimática. El nivel de actividad de una enzima amilolítica apropiada para el invento puede determinarse mediante numerosos métodos. Un método apropiado es el método de análisis del 3,5-dinitrosalicilato. Según este método, se deja que una muestra de amilasa catalice la hidrólisis de los enlaces 1,4- -glicosídicos del almidón y glicógenos durante 5 minutos a una temperatura de 37° C a un pH de 6,0. La reacción finaliza añadiendo 3,5-dinitrosalicilato sódico tamponado, se desarrolla, el color y se determina la cantidad de maltosa por respuesta o reacción espectrofotométrica y comparación con soluciones de hidrato de maltosa de grado analítico. La amilasa tiene una unidad de actividad por cada 0,4 mg de hidrato de maltosa producida durante la hidrólisis en las condiciones especificadas. El método de la actividad amilásica es bien conocido y lo describe de un modo particular P. Bernfeld, en *Methods in Enzymol*, volumen 1, pagina 149 (1955).
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- Según se ha descrito anteriormente, el presente invento se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que se pueden conseguir periodos prolongados de estabilización de las enzimas incorporando en soluciones enzimáticas acuosas una combinación de sal cálcica hidrosoluble y compuesto o estabilizador orgánico descritos anteriormente. Las sales hidrosolubles de calcio comprenden, por ejemplo, cloruro de calcio, acetato de calcio, citrato de calcio, fosfato de glicerol cálcico, gluconato
- 25.
- 30.



- de calcio, glucoheptanato de calcio, lactato de calcio, levulinato de calcio, lactobionato de calcio, malato de calcio, lactofosfato de calcio, succinato de calcio, maleato de calcio y sulfato de calcio. Las composiciones estabilizadas del invento se preparan de forma que contengan aproximadamente de un 0,001 % a un 1 % de la composición estabilizada con respecto al ión calcio. De preferencia se emplea aproximadamente de un 0,005 % a un 0,05 % con respecto al ión calcio, para una mejor estabilización.
5. Según se ha descrito anteriormente, algunos de los preparados enzimáticos disponibles en el mercado e idóneos para el invento contienen, además de enzima activa, ciertas materias inertes que comprenden, por ejemplo, cloruro de calcio o sulfato de calcio. Cuando se emplea dicho preparado enzimático como fuente de enzima amilolítica, también se incorpora con dicho preparado una cantidad de ión calcio. Se proporciona convenientemente ión calcio adicional añadiendo una o más de las sales de calcio descritas anteriormente para formar un nivel de ión calcio dentro de la escala anteriormente mencionada. Las sales de calcio preferidas comprenden acetato de calcio, sulfato de calcio y cloruro de calcio.
10. Los coestabilizadores orgánicos que junto con el ión calcio proporcionan una mayor actividad enzimática amilolítica comprenden los glicoles alifáticos y 1,3-propanodiol. Los glicoles alifáticos empleados con el invento tienen la fórmula
- 15.
- 20.

25.
$$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$$
en la que x es aproximadamente de 1 a 200, y comprenden etilenglicol y los polietilenglicoles. Los polietilengli





- coles útiles con el invento son aquellos en los que x en la fórmula arriba descrita oscila de 2 a 200 aproximadamente y comprenden dietilenglicol, trietilenglicol y los polímeros correspondientes de óxido de etileno,
5. donde el número promedio de grupos oxietileno oscila en sentido ascendente de 4 (tetraetilenglicol) a aproximadamente 200.
- Los glicoles alifáticos útiles con el invento varían en consistencia de líquidos ligeros a sólidos blancos cereos y se disuelven en agua para formar soluciones transparentes. Los glicoles alifáticos preferidos con el invento comprenden dietilenglicol y trietilenglicol. Asimismo son preferibles los polietilenglicoles en los que el valor promedio de x es de 4 a 80
10. aproximadamente. Estos polietilenglicoles tienen de pesos moleculares promedios de aproximadamente 200 a aproximadamente 3.500 y se encuentran en el mercado con la marca registrada "Carbowax", con designación numérica que se refiere al peso molecular del promedio, v.g., 200,
15. 400, 600, 1.000 y así sucesivamente. La graduación numérica ascendente corresponde a un aumento en peso molecular, un aumento en el punto de fusión y una disminución en hidrosolubilidad. Se pueden emplear con el invento mezclas de glicoles alifáticos.
- 20.
25. Se ha descubierto que el 1,3-propanodiol proporciona también un efecto estabilizador de la enzima amilolítica según se ha descrito anteriormente. Este compuesto es un agente coestabilizador preferido con el invento y proporciona efectos estabilizadores excelentes.
30. Las composiciones orgánicas coestabilizadoras de



- enzimas amilolíticas de este invento se emplean en cantidades pequeñas pero eficaces del orden de aproximadamente un 2 % a un 27 % del peso del compuesto. De preferencia los compuestos estabilizados se preparan de forma
5. que contengan aproximadamente de un 5 % a un 20 % en peso del agente coestabilizador. Es preferible el límite superior desde el punto de vista de conseguir efectos estabilizadores óptimos, particularmente en largos periodos de almacenamiento a temperaturas elevadas.
10. A pesar de que no se conoce con precisión el mecanismo mediante el cual las sales cálcicas y el agente coestabilizador orgánico descritos anteriormente, actúan conjuntamente para proteger las enzimas amilolíticas contra las pérdidas de actividad, la combinación de sal y
15. compuesto orgánico proporciona niveles de estabilidad enzimática sensiblemente mayores que los que se pueden conseguir mediante estabilización normal con calcio solamente. Este efecto de estabilización se observa aún en presencia de proteasas que tienen a ejercer un efecto
20. de desnaturalización perjudicial sobre las α -amilasas.
- En las composiciones de este invento se pueden emplear detergentes hidrosolubles iniónicos y zwitteriónicos, como componentes opcionales. Estos detergentes realzan considerablemente la estabilidad al almacenamiento de las enzimas amilolíticas empleadas con el invento y mejoran notablemente las características detergentes de la composición. Debido a estas características útiles, es preferible incluir detergentes iniónicos y zwitteriónicos en las composiciones enzimáticas acuosas del invento.
- 25.
30. Los detergentes iniónicos y zwitteriónicos pueden utili-



zarse con el invento en cantidades que oscilan de un 0 % a aproximadamente un 15 %, y preferiblemente de un 4 % a un 10 %, basado en el peso de la composición con contenido enzimático.

5. Entre los ejemplos de detergentes iniónicos apropiados para uso con el invento se encuentran:

(1) Los condensados de óxido de polietileno de alquilfenoles, v.g., los productos de condensación de alquilfenoles que tienen un grupo alquilo que contiene aproximadamente de 6 a 12 átomos de carbono en cadena recta o ramificada con óxido de etileno, encontrándose presente dicho óxido de etileno en cantidades iguales a 5 hasta 25 moles de óxido de etileno por mol de alquilfenol. El sustituyente alquilo en dichos compuestos puede derivarse de propileno polimerizado, diisobutileno, octeno o noneno, por ejemplo.

(2) Aquellos detergentes sintéticos iniónicos derivados de la condensación de óxido de etileno con el producto resultante de la reacción de óxido de propileno y etilendiamina. Por ejemplo, son satisfactorios los compuestos que contienen aproximadamente de un 40 % a un 80 % en peso de polioxietileno y que tienen un peso molecular de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 11.000, resultantes de la reacción de grupos de óxido de etileno con una base hidrófoba constituida por el producto de reacción de etilendiamina y óxido de propileno en exceso, teniendo dicha base un peso molecular del orden de 2.500 a 3.000.

(3) El producto de condensación de 1 mol de alcoholes alifáticos que tengan de 8 a 22 átomos de carbono,

374708

1901

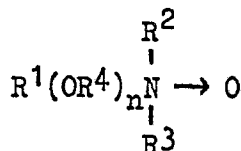


5. con una configuración de cadena recta o ramificada, con 5 a 40 moles de óxido de etileno, v.g., un condensado de alcohol de coco-óxido de etileno que tenga de 5 a 40 moles de óxido de etileno por mol de alcohol de coco, teniendo la fracción de alcohol de coco de 10 a 14 átomos de carbono.

10. (4) Las amidas insustituidas y las amidas de monoetanol y dietanol de ácido graso que tienen mitades acilo de aproximadamente 8 a 22 átomos de carbono. Estas mitades acilo se derivan normalmente de glicéridos de origen natural (v.g., aceite de coco, aceite de palma, aceite de soja y sebo), pero pueden derivarse sintéticamente (v.g., por la oxidación de petróleo, o por hidrogenación de monóxido de carbono por el procedimiento Fischer-Tropsch).

15.

(5) Oxidos de amina terciaria de cadena larga correspondientes a la fórmula general que sigue:



20. en la que R¹ es un radical alquilo con unos 8 a unos 22 átomos de carbono, R² y R³ son cada uno radicales metilo, etilo o hidroxietilo, R⁴ es etileno y n es igual a 0 hasta aproximadamente 10. La flecha en la fórmula es una representación tradicional de un enlace semipolar. Entre los ejemplos específicos de detergentes de óxido de amina se encuentran: óxido de dimetildodecilamina y óxido

25. de di-(2-hidroxietil)-dodecilamina.

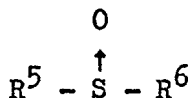


(6) Oxidos de fosfina terciaria de cadena larga correspondiente a la fórmula general que sigue:



- en la que R es un radical alquilo, alqueniilo o monohidroxialquilo que tiene aproximadamente de 10 a 22 átomos de carbono en la longitud de su cadena y R' y R'' son cada uno grupos alquilo o monohidroxialquilo que contienen de 1 a 3 átomos de carbono. La flecha en la fórmula es una representación tradicional de un enlace semipolar. En la patente Estadounidense 3.304.263, publicada el 14 de febrero de 1967, se encuentran ejemplos de óxido de fosfina apropiados y comprenden: Oxido de dimetildodecilo fosfina y óxido de di-(2-hidroxietil)dodecilo fosfina.

(7) Sulfóxidos de cadena larga que tienen la fórmula:



15. en la que R⁵ es un radical alquilo que contiene aproximadamente de 10 a 22 átomos de carbono, de 0 a aproximadamente 5 enlaces éter y de 0 a aproximadamente 2 sustituyentes hidroxilo, encontrándose por lo menos una parte de R⁵ ininterrumpida por enlaces éter y conteniendo aproximadamente de 10 a 18 átomos de carbono, y en la que R⁶ es un radical alquilo que contiene de 1 a 3 átomos de carbono y de 0 a 2 grupos hidroxilo. Se citan como ejemplos específicos de estos sulfóxidos: dodecilmethylsulfóxido y 3-hidroxitridecilmethylsulfóxido.
- 20.
25. Los detergentes sintéticos zwitteriónicos apropiados



- dos para el invento pueden describirse en términos generales como derivados de compuesto alifáticos de amonio cuaternario, fosfonio y sulfonio, en los que el radical alifático puede ser de cadena recta o ramificada, y en
5. los que uno de los sustituyentes alifáticos contiene de unos 8 a unos 22 átomos de carbono y otro contiene un grupo hidrosolubilizante aniónico, v.g., carboxi, sulfo, sulfato, fosfato o fosfono. Entre los ejemplos de compuestos comprendidos dentro de esta definición se encuentran:
10. 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)-propano-1-sulfonato y 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)-2-hidroxipropano-1-sulfonato. Para tener más ejemplos de detergentes sintéticos zwitteriónicos vease la patente Canadiense 708.147, publicada el 20 de abril de 1965, de Diehl and
15. Smith, "lavado de telas en agua fría que contiene una composición detergente sintético", en la página 6, líneas 1-22. Esta patente se incorpora específicamente en la presente memoria descriptiva a título de referencia únicamente.
20. Se pueden emplear mezclas de varios detergentes iniónicos o mezclas de detergentes iniónicos y detergentes zwitteriónicos. Para el invento son preferibles los productos de condensación de un mol de alcohol alifático que tenga de 8 a 22 átomos de carbono con 5 a 40 moles
25. de óxido de etileno, v.g., alcohol de sebo etoxilado con 11 ó 30 moles de óxido de etileno y alcohol de coco etoxilado con 6 moles de óxido de etileno. Asimismo son preferibles los 3-(N,N-dimetil-N-alquilamonio)-2-hidroxipropano-1-sulfonatos en los que el alquilo tiene de 8 a 22
30. átomos de carbono, v.g., 3-(N,N-dimetil-N-cocoalquilamo-

374708¹⁹ DI



nio)-2-hidroxiopropano-1-sulfonato y los 3-(N,N-dimetil-N-alquilamonio)-propano-1-sulfonato en los que el alquilo tiene de 8 a 22 átomos de carbono, v.g., 3-(N,N-dimetil-N-seboalquilamonio)-propano-1-sulfonato.

5. Estos compuestos, además de proporcionar estabilidad amilásica per se, realzan la estabilización del compuesto orgánico y el calcio. Además proporcionan excelentes propiedades de detergencia.
Se pueden preparar las composiciones estables del presente invento aproximadamente con un 65 % a un 97 % en peso de agua. De preferencia se emplea de un 72 % a un 95 % aproximadamente. Es preferible emplear agua desmineralizada, aún cuando no sea absolutamente imprescindible.
10. Los diversos componentes de las composiciones enzimáticas de este invento pueden mezclarse entre sí en cualquier orden. No obstante, es preferible preparar primero una mezcla de estabilizador-agua y añadirse las enzimas a dicha mezcla para evitar cualquier degradación o desactivación que pudiera ocurrir al añadir la enzima al agua que no contuviera la combinación estabilizadora de enzimas del invento. Los componentes detergentes opcionales pueden añadirse en cualquier momento.
El pH de las composiciones enzimáticas acuosas estabilizadas de este invento oscila generalmente de 5,0 a 10,0 aproximadamente, y preferiblemente de 6,5 a 8,5 aproximadamente. Los efectos máximos de estabilización se obtienen dentro de la escala de pH preferente. El pH se puede elevar con una base, v.g., hidróxido de sodio o potasio o reducirse con un ácido, v.g., ácido clorhídrico.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



También es preferible, aún cuando no imprescindible, añadir un preservativo a las composiciones para evitar el desarrollo bacteriano y fungal. En general se utiliza acetato de fenilmercurio en cantidades del orden de aproximadamente 10 a 400 ppm de las composiciones. Con el presente invento se puede emplear cualquier preservativo que sea compatible con los componentes de las composiciones.

Las composiciones acuosas estabilizadas de este invento pueden contener también cualquier adyuvante normal para detergentes, diluyentes y aditivos en tanto que no interfieran prácticamente con la actividad de los componentes enzimáticos. Por ejemplo, se pueden emplear perfumes, agentes antimanchas, sales inertes tales como el sulfato de sodio, agentes de antirredeposición, agentes bacteriostáticos, tintes o colorantes, fluorescentes, espumantes, antiespumantes y otros, sin perjudicar las propiedades ventajosas de estas composiciones. Es preferible que las composiciones del presente invento contengan además ciertas enzimas proteolíticas. Estas enzimas comprenden proteasas alcalinas, proteasas neutras y proteasas ácidas que ayudan materialmente a eliminar la suciedad y manchas proteínaceas de los géneros textiles lavados. El empleo de enzimas proteolíticas en combinación con las enzimas amilolíticas del presente invento es preferible desde el punto de vista de facilitar la eliminación de un amplio espectro de manchas y suciedades varias. Las enzimas proteolíticas preferidas son las subtilisinas, obtenidas del organismo bacteriano *Bacillus subtilis*. Cuando se incluyen enzimas proteolíti-

- 374708



- cas en las composiciones del presente invento, es conveniente incluir cualquiera de los materiales estabilizadores de enzimas proteolíticas conocidos en la profesión para realzar con ello la actividad enzimática proteolítica en almacenamiento. Los materiales estabilizadores de enzimas proteolíticas apropiados se describen por ejemplo en la solicitud nº de serie 683.196, titulada "Preparado enzimático acuoso estabilizado", presentada el 15 de noviembre de 1967 por Charles Bruce McCarty.
- 5.
10. Las composiciones de este invento pueden emplearse como eliminadores de manchas, aditivos para detergentes o como composiciones detergentes de limpieza per se. Estas composiciones pueden envasarse en frascos o tubos del tipo aerosol y utilizarse convenientemente para eliminar manchas relativamente pequeñas de géneros o pueden emplearse en mayores cantidades como aditivos para otras composiciones detergentes. Estas composiciones pueden sustituir a las lejías de hipoclorito puesto que eliminan cualquiera de las manchas que estas lejías eliminan, no debilitan las fibras textiles, y no atacan ni degradan los fluorescentes y blanqueadores. Añadiendo detergentes opcionales iniónicos y/o zwitteriónicos, estas composiciones pueden utilizarse per se como excelentes composiciones de limpieza en una amplia variedad de condiciones de lavado..
- 15.
- 20.
- 25.

Ejemplos

- Los ejemplos que siguen sirven simplemente para ilustrar el invento con detalle específico y, cuando se toman junto con la descripción anterior, ayudarán a determinar el pleno alcance del presente invento. Los ejem
- 30.



plos son simplemente ilustrativos y no se pretende con ellos limitar o restringir este invento. Todas las partes, porcentajes y proporciones expuestos en los mismos se dan en peso a menos que se indique lo contrario.

5. Las composiciones que siguen se prepararon y almacenaron en frascos de cristal cerrados durante los periodos de tiempo indicados en la tabla I. Cada compuesto contenía un 10 % en peso del agente coestabilizador orgánico; 1 % de CRD-Proteasa (una mezcla disponible en el mercado de proteasas y amilasas derivadas de *Bacillus subtilis*); y un 89 % de una solución acuosa que contiene un 0,01 % de monohidrato de acetato cálcico y un 0,29 % de cloruro de sodio. La actividad amilolítica de cada compuesto se midió en los intervalos indicados empleando el método de análisis descrito anteriormente.
- 10.
- 15.

- También se valoraron muestras de contrastación almacenadas en condiciones idénticas para averiguar su retención de actividad enzimática. En la muestra de contrastación N^o 1 no se empleó agente coestabilizador orgánico. En la muestra de contrastación N^o 2 no se empleó agente coestabilizador orgánico y la solución madre se reemplazó por agua destilada, v.g., no había presente monohidrato de acetato cálcico o cloruro de sodio. Los resultados obtenidos se registraron como sigue:
- 20.

374708

19 DIC. 1960



T A B L A I

Ejemplo	Porcentaje Ca ⁺⁺	Agente coestabilizador orgánico	Porcentaje de actividad remanente después de almacenamiento a 37,6°C durante			
			----- semanas -----	----- semanas -----	----- semanas -----	----- semanas -----
			<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>
Muestra de contrastación N° 1	0,0023	Ninguno	54	34	29	17
Muestra de contrastación N° 2	Ninguno	Ninguno	0*	--	--	--
1	0,0021	Etilenglicol	70	51	34	28
2	0,0021	Dietilenglicol	71	64	44	37
3	0,0021	1,3-propanodiol	60	47	43	35

* 3 días

Se prepararon las composiciones estabilizadas que siguen, ejemplos 4 a 29. En cada ejemplo, el agua (que contenía monohidrato de acetato cálcico y cloruro de sodio), agente coestabilizador orgánico y etanol (cuando se empleó) se mezclaron perfectamente, se añadió el detergente iniónico o zwitteriónico y la enzima por último. Las enzimas empleadas fueron Alcalase (un preparado enzimático proteolítico que tiene un contenido en enzima cristalina de aproximadamente un 6 % y que se deriva de *Bacillus subtilis*); y/o Monsanto CRD-Protease (una mezcla de enzimas proteolíticas y amilolíticas derivadas de *Bacillus subtilis*). El etanol, cuando se encontraba presente, se empleó como estabilizador para la enzima proteolítica. En cada ejemplo, se empleó una solución madre acuosa, descrita anteriormente, en una cantidad para complementar el resto del compuesto al 100 %. Los compuestos se almacena



374708

ron durante los periodos de tiempo indicados en la tabla II a una temperatura de 37,6°C y se valoró su actividad amilolítica según se ha descrito anteriormente. Los compuestos de los ejemplos 4 a 29 se comportaron bien como eliminadores de manchas, como aditivos para compuestos detergentes y como detergentes para el lavado de ropa per se.

T A B L A II

374700

Ejm.	Ca ++	Etanol	% coestabilizador orgánico	% enzima	
				Alcalase	Monsanto CRP
4	0,0017	10	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5
5	0,0019	5	Dietilenglicol (5 %)	0,5	0,5
6	0,0017	10	Trietilenglicol(10 %)	0,5	0,5
7	0,0019	5	Trietilenglicol(5 %)	0,5	0,5
8	0,0017	10	Polietilenglicol 380 (10%)	0,5	0,5
9	0,0019	5	Polietilenglicol 380 (5%)	0,5	0,5
10	0,0017	10	Polietilenglicol 4000 (10%)	0,5	0,5
11	0,0019	5	Polietilenglicol 4000 (5 %)	0,5	0,5
12	0,0020	--	Trietilenglicol (10 %)	0,5	0,5
13	0,0020	--	Polietilenglicol 4000 (10%)	0,5	0,5
14	0,0019	10	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5
15	0,0017	10	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5
16	0,0017	10	Trietilenglicol (10 %)	0,5	0,5
17	0,0017	10	Polietilenglicol 380 (10%)	0,5	0,5
18	0,0017	10	Polietilenglicol 4000 (10%)	0,5	0,5
19	0,0020	--	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5
20	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0
21	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0
22	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0
23	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0
24	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0
25	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0
26	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0
27	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0
28	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0
29	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0

-23- Psi

374708

% remanente después de un almacenamiento a 37,6°C durante

A	% agente tensioactivo					
	B	C	D	E	----- semanas -----	
5	---	---	---	---	100	100
5	---	---	---	---	100	79
5	---	---	---	---	100	83
5	---	---	---	---	98	70
5	---	---	---	---	90	83
5	---	---	---	---	82	61
5	---	---	---	---	70	42
5	---	---	---	---	79	32
---	---	---	---	---	90	100
---	---	---	---	---	78	87
---	---	---	---	---	68	75
---	---	5	---	---	95	77
---	---	---	---	---	100	85
---	---	---	5	---	91	73
---	---	---	---	5	87	69
---	---	---	---	---	96	73
10	---	---	---	---	---	95
---	10	---	---	---	---	87
---	---	10	---	---	---	59
---	---	---	10	---	---	51
---	---	---	---	10	---	48
10	---	---	---	---	---	89
---	10	---	---	---	---	77
---	---	10	---	---	---	86
---	---	---	10	---	---	100
---	---	---	---	10	---	100

19 DIC. 1969



374701

T A B L A II

Ejm.	Ca ⁺⁺ %	Etanol %	% coestabilizador orgánico	% enzima		% a
				Alcalase	Monsanto CRD	
4	0,0017	10	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5	5
5	0,0019	5	Dietilenglicol (5 %)	0,5	0,5	5
6	0,0017	10	Trietilenglicol(10 %)	0,5	0,5	5
7	0,0019	5	Trietilenglicol(5 %)	0,5	0,5	5
8	0,0017	10	Polietilenglicol 380 (10%)	0,5	0,5	5
9	0,0019	5	Polietilenglicol 380 (5%)	0,5	0,5	5
10	0,0017	10	Polietilenglicol 4000 (10%)	0,5	0,5	5
11	0,0019	5	Polietilenglicol 4000 (5 %)	0,5	0,5	5
12	0,0020	--	Trietilenglicol (10 %)	0,5	0,5	--
13	0,0020	--	Polietilenglicol 4000 (10%)	0,5	0,5	--
14	0,0019	10	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5	--
15	0,0017	10	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5	--
16	0,0017	10	Trietilenglicol (10 %)	0,5	0,5	--
17	0,0017	10	Polietilenglicol 380 (10%)	0,5	0,5	--
18	0,0017	10	Polietilenglicol 4000 (10%)	0,5	0,5	--
19	0,0020	--	Dietilenglicol (10 %)	0,5	0,5	--
20	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0	10
21	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0	--
22	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0	--
23	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0	--
24	0,0018	--	Dietilenglicol (10 %)	---	1,0	--
25	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0	10
26	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0	--
27	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0	--
28	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0	--
29	0,0018	--	1,3-propanodiol (10 %)	---	1,0	--

-23- Bis

374708



% remanente } después de
un almacenamiento a
37,6°C durante
----- semanas -----

% agente tensioactivo

A	B	C	D	E	2	4	6	8
5	--	--	--	--	100	100	88	100
5	--	--	--	--	100	79	50	50
5	--	--	--	--	100	83	58	63
5	--	--	--	--	98	70	53	30
5	--	--	--	--	90	83	45	33
5	--	--	--	--	82	61	31	11
5	--	--	--	--	70	42	18	7
5	--	--	--	--	79	32	18	4
--	--	--	--	--	90	100	100	100
--	--	--	--	--	78	87	83	82
--	5	--	--	--	68	75	59	59
--	--	5	--	--	95	77	45	54
--	--	--	5	--	100	85	75	74
--	--	--	5	--	91	73	64	65
--	--	--	5	--	87	69	57	64
--	--	--	--	--	96	73	73	75
10	--	--	--	--	---	95	---	89
--	10	--	--	--	---	87	---	72
--	--	10	--	--	---	59	---	49
--	--	--	10	--	---	51	---	36
--	--	--	--	10	---	48	---	30
10	--	--	--	--	---	89	---	81
--	10	--	--	--	---	77	---	72
--	--	10	--	--	---	86	---	65
--	--	--	10	--	---	100	---	55
--	--	--	--	10	---	100	---	74



19 DIC. 1969

374708 90111989



- * A - Alcohol de sebo etoxilado con 11 moles de óxido de etileno
- * B - Alcohol de sebo etoxilado con 30 moles de óxido de etileno
- 5. * C - Alcohol de coco etoxilado con 6 moles de óxido de etileno
- * D - HAPS - 3-(N,N-dimetil-N-alquilamonio)2-hidroxiopropano-1-sulfonato en el que el grupo alquilo se deriva de alcohol de coco de fracción media: 2 % C₁₀; 66 % C₁₂; 23 % C₁₄ y 9 % C₁₆.
- 10. * E - 3-(N,N-dimetil-N-seboalquilamonio)propano-1-sulfonato.

Ejemplo 30

15. Se formuló un compuesto enzimático acuoso estabilizado según este invento partiendo de los componentes que siguen:

<u>Componente</u>	<u>% en peso</u>
α-amilasa (Diasmen, Daiwa Kasei KK)	1
Cloruro de calcio	0,01
20. Polietilenglicol 4.000	10
Alcalasa (6 % enzima proteolítica)	1
Etanol	10
Agua	78

25. Esta composición se puede emplear sin dilución como una composición para la eliminación de suciedad y manchas, para eliminar o facilitar la eliminación de materia de almidón y proteinacea de géneros textiles. La eficacia de eliminación de suciedad y manchas queda demostrada aún después de largos periodos de almacenamiento (8 semanas) a temperatura elevada (48,8°C). La

30.

-25-
374708 11.9 DIC. 1969



5. composición de este ejemplo puede emplearse como un aditivo para formulaciones de detergentes comerciales. Cuando se añade aproximadamente 1,2 cc. del compuesto por cada 3,78 litros de solución de lavado, quedan demostradas las excelentes propiedades de eliminación de suciedad y manchas del producto.

Ejemplo 31

10. Se obtuvieron resultados similares cuando se emplearon los compuestos coestabilizadores orgánicos que siguen en lugar de los compuestos coestabilizadores empleados en los ejemplos 1 a 29 en el sentido de que la enzima amilolítica se estabilizó en solución acuosa: Etilenglicol; dietilenglicol; trietilenglicol; tetraetilenglicol; polietilenglicol 200; polietilenglicol 300; 15. polietilenglicol 380; polietilenglicol 600; polietilenglicol 1.000; polietilenglicol 1.500; polietilenglicol 4.000; polietilenglicol 6.000; y 1,3-propanodiol.

20. Se obtuvieron resultados similares cuando se emplearon las enzimas amilolíticas que siguen en lugar de las empleadas en los ejemplos 1 a 29, en el sentido de que la α -amilasa se estabilizó en solución acuosa: Diamen α -amilasa; Rapidasa α -amilasa THG-25; Novo Bacterial α -amilasa; Wallerstein α -amilasa; Rhozyme-33 y Rhozyme H-39.

25. Se obtuvieron resultados similares cuando se emplearon los detergentes iniónicos y zwitteriónicos en lugar de los etoxilados de alcohol de sebo, etoxilado de alcohol de coco, 3-(N,N-dimetil-N-cocofracción medio-alquilamonio)-2-hidroxiopropano-1-sulfonato y 3-(N,N-dimetil-N-seboalquilemonio) propano-1-sulfonato empleados en 30.



- los ejemplos 4 a 11, 14 a 18 y 20 a 29 en el sentido de que se realizó la estabilización por ión calcio y compuesto estabilizador orgánico y porque se proporcionaron excelentes propiedades de limpieza: Decilfenol etoxilado
- 5. con 20 moles de óxido de etileno por mol de decilfenol, hexadecanoamida, hexadecanodietanolamida, óxido de dimetildodecilamina, óxido de dimetildodecilfosfina y dodecilmetilsulfóxido, el producto de condensación de óxido de etileno con el producto de condensación de óxido de
 - 10. propileno con propilenglicol, siendo la parte de óxido de etileno del compuesto un 50 % del peso total del compuesto y siendo el peso molecular total del compuesto de aproximadamente 1.700; el producto de condensación óxido de etileno con el producto de condensación de óxido de
 - 15. propileno y etilendiamina en el que el producto contenía aproximadamente un 65 % de óxido de polietileno en peso y el peso molecular total del compuesto era 6.000.
- Se obtuvieron resultados similares cuando el monohidrato de acetato cálcico de los ejemplos 1 a 29 se
- 20. reemplazó por las sales cálcicas que siguen, en cantidades que proporcionaban una cantidad igual de ión de calcio, en el sentido de que se observaba estabilización de la enzima amilolítica en solución acuosa: Cloruro de calcio; citrato de calcio; fosfato de glicerol cálcico; gluconato cálcico;
 - 25. glucocheptanato cálcico; lactato cálcico; levulinato cálcico; lactobionato cálcico; malato cálcico; lactofosfato cálcico; succinato cálcico; maleato cálcico y sulfato cálcico.

- N O T A -

- 30. Descrita suficientemente la naturaleza del inven-

374708



- to, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una
5. Solicitud de Patente, presentada en Norteamérica, con fecha 23 de diciembre de 1968, bajo el número 786.432, acogándose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que
10. constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR COMPOSICIONES ENZIMATICAS ACUOSAS ESTABILIZADAS; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1ª.- Procedimiento para preparar composiciones enzimáticas acuosas estabilizadas, caracterizado porque comprende mezclar un 65 % a un 97 % de agua aproximadamente, con un 0,001 % a un 1 % de enzima amilolítica aproximadamente, con un 0,001 % a un 1 % aproximadamente, con respecto al ión calcio, de una sal cálcica hidrosoluble estabilizadora de enzimas, con un 2 % a un 27 % aproximadamente de un compuesto coestabilizador orgánico elegido del grupo consistente en glicoles alifáticos de fórmula
20.
$$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$$
25. en la que x es aproximadamente de 1 a 200; y 1,3-propanodiol; y con 0 a aproximadamente un 15 % de un detergente elegido del grupo consistente en detergentes iniónicos y detergentes zwitteriónicos, basándose los porcentajes en

1904
374708



el peso de la composición.

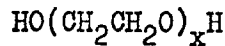
5. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca
racterizado porque como enzima amilolítica se mezcla una
α-amilasa que tiene actividad amilolítica en un pH del
orden de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10 y a
una temperatura del orden de 15,5°C a 65,5°C aproximada
mente.

10. 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1
y 2, caracterizado porque la α-amilasa se deriva de Ba
cillus subtilis.

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1
a 3, caracterizado porque la α-amilasa se mezcla en una
cantidad de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente
un 0,5 %.

15. 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1
a 4, caracterizado porque el ión calcio se mezcla en una
cantidad de aproximadamente un 0,005 % a un 0,05 % y el
compuesto coestabilizador orgánico en una cantidad de
aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %.

20. 6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1
a 5, caracterizado porque el compuesto coestabilizador
orgánico se elige del grupo consistente en etilenglicol;
dietilenglicol; trietilenglicol; glicoles de fórmula:



25. en la que el valor promedio de x es de 4 a 80 aproximada
mente; y 1,3-propanodiol.

7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1
a 6, caracterizado porque se mezcla de un 4 % a un 10 %

37470819 DIC. 1969



aproximadamente de un detergente iniónico o un detergente zwitteriónico.

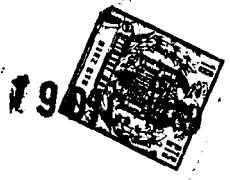
5. 8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el detergente se elige del grupo consistente en productos de condensación de un mol de un alcohol alifático que tiene de 8 a 22 átomos de carbono con 5 a 40 moles de óxido de etileno; 3-(N,N-dimetil-N-alquilamonio)-propano-1-sulfonato en el que el alquilo tiene de 8 a 22 átomos de carbono; y 3-(N,N-dimetil-N-alquilamonio)-2-hidroxiopropano-1-sulfonato en el que el alquilo tiene de 8 a 22 átomos de carbono.

10. 9ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque como detergente se mezcla 3-(N,N-dimetil-N-cocoalquilamonio)-2-hidroxiopropano-1-sulfonato y como compuesto coestabilizador orgánico trietilenglicol.

15. 10ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la sal cálcica se elige del grupo consistente en acetato de calcio, sulfato de calcio y cloruro de calcio.

20. 11ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se mezcla una proteasa.

25. 12ª.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque como proteasa se mezcla una proteasa alcalina derivada de *Bacillus subtilis*.



374708

13ª.- Procedimiento para preparar composiciones enzimáticas acuosas estabilizadas, tal y como queda sustanciálmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 30 hojas escritas a máqui

5. na por una sola cara.

Madrid

19 DIC. 1969

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

SOMER REBO Y MODEI

Por: Fernando F. Hernández Ruiz