

German Appln.  
P-19-13-869.3

377 175

SECCION TECNICA
GRANUACION
CLASE 607 611
SUBCLASE 9 d

**Memoria descriptiva**



14 OCT 1970

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de COLGATE-PALMOLIVE COMPANY

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 300 Park Avenue, Nueva York, N. Y., Estados Unidos de América.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ENZIMAS"  
(Clase Internacional C11d C07g)

5.10.70

14 OCT.



5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la obtención de enzimas fácilmente hidrosolubles, exentas de inhibidores y apropiadas preferentemente para el uso en composiciones detergentes, así como a composiciones detergentes que contengan las mismas, y a un procedimiento para la obtención de dichas composiciones detergentes.

10 Es conocido el emplear detergentes pulverulentos ó granuladores que contengan enzimas. A este particular se prefieren por lo general hidrolasas ó proteinasas, tripsina, esterases, carbohidrasas, lipasas y nucleasas. En algunos casos se emplean también oxidasas, transferasas y transfosforilasas, bien sea solas, ó bien en combinación. Estas enzimas se pueden obtener a partir de productos vegetales ó animales, ó bien se cultiva parcialmente por vía bacteriana. El empleo de enzimas en detergentes presenta dificultades considerables, debido a que la extracción por vía enzimática de la suciedad existente en las fibras de la ropa tiene lugar en condiciones que son totalmente distintas a las que corresponden a un efecto análogo de algunas enzimas "in vivo". Esta diferencia es debida al hecho de que las enzimas aisladas se comportan de manera absolutamente distinta que "in vivo", cuando se encuentran en presencia de agentes tensoactivos ó ten-

15

20

25

30

sidos a valores de pH modificados o bien en otras condiciones de temperatura y en presencia de otros materiales cualesquiera existentes en las composiciones detergentes. Así por ejemplo, se separan ya durante el aislamiento de las enzimas sustancias proteinaceas de bajo peso molecular que, contienen las coenzimas ó cofactores precisos para la ac-



tivación y, que poseen además un determinado efecto de co-  
 loide protector. Además las composiciones detergentes secas,  
 tales como productos de lavado, de limpieza o de remojo y  
 lejías de lavado contienen sustancias que tienen un efecto  
 5 perjudicial sobre los productos proteínicos de alto peso  
 molecular, de los que están constituidas las enzimas; estas  
 sustancias incluyen, por ejemplo las sales de metal alcali-  
 no existentes en los productos de lavado y que originan  
 un aumento del valor pH, así como sales de metales pesados  
 10 incorporadas, determinadas sustancias de actividad super-  
 ficial existentes en los productos de lavado, en particu-  
 lar detergentes aniónicos así como también determinados  
 brillantadores ópticos y sustancias olorosas.

Otros productos de lavado contienen, en calidad  
 15 de sustancia blanqueadora, perborato sódico en cantidades  
 de, por ejemplo, 10 a 20% en peso, que a temperaturas de  
 por encima de 60°C, libera oxígeno activo. Con ello se ha-  
 ce el baño de lavado en fuertemente alcalino, lo que ori-  
 gina que las enzimas no adaptadas de procedencia animal,  
 20 bacteriana y vegetal, sean modificadas de tal modo por oxi-  
 dación y adsorción, que se reduce fuertemente la acción  
 enzimática.

Aunque se conocen detergentes que contienen pro-  
 teinasas bacterianas que parecen ser estables en las lejías  
 25 de lavado hasta aproximadamente 80°C y que, en presencia  
 de perborato sódico, son todavía hidrolíticamente activas  
 hasta un valor pH de 9 a 10, se ha comprobado que estas  
 composiciones detergentes tienen solamente una pequeña  
 eficacia enzimática y que el efecto apreciable se consi-  
 30 gue tan solo debido a la acción blanqueante del perborato.



Aparte de ésto, los silicatos de magnesio agregados como estabilizadores del perborato sódico, al igual que en general todos los metasilicatos ó trisilicatos tienen cierta influencia sobre cualquier proteinasa, independientemente de su procedencia animal, vegetal ó bacteriana. A este particular las proteinasas purificadas ó cristalizadas son todavía mas inestables que las enzimas no purificadas, ya que estas últimas contienen sub-productos coloidales, que ejercen una cierta acción protectora al menos durante un corto tiempo.

Las proteinasas obtenidas por los procedimientos de obtención conocidos contienen cantidades considerables de inhibidores de la proteinasa, tales como el inhibidor de las habas de soja ó el inhibidor del páncreas de todos los mamíferos. Se ha intentado debilitar la acción de tales inhibidores mediante la adición de pepsina, lo que presumiblemente se basa en que la pepsina degrada determinados productos proteínáceos, tales como la edestina y la globulina; ahora bien, esto es únicamente satisfactorio en un intervalo de pH de 4,0 hasta 7,0, es decir, en un valor pH que no se puede mantener practicamente siempre composiciones detergentes y, en especial, en composiciones detergentes que contienen mejoradores de detergencia alcalinos.

Los inhibidores contenidos en proteinasas son compuestos con caracter de polipeptido, a saber, las que tienen un peso molecular de 6.000 hasta 12.000, desde 20.000 hasta 60.000. La separación de estos inhibidores ofrece considerables dificultades, ya que los inhibidores de elevado peso molecular no son dializables, mientras que los inhibidores de bajo peso molecular son estables



frente a los ácidos y al calor, (en contraposición a los inhibidores de alto peso molecular). A esto se viene a sumar que numerosas clases de suciedad de ropa de casa ensuciada en la forma usual, actúan ya en sí como inhibidores para las enzimas. Así, por ejemplo, la harina de trigo tiene una capacidad considerable de inhibición para la tripsina y las proteinasas vegetales, de modo que la utilización de composiciones detergentes que contienen tripsina usual no son efectivos para quitar numerosas manchas tales como, manchas de salsas ó de flanes,

Otro inconveniente de las enzimas de procedencia bacteriana estriba en que las proteinasas de bacterias rompen únicamente determinados enlaces de péptido, mientras que las proteinasas de páncreas del tipo de la tripsina disocian los enlaces péptidos de aminoácidos no aromáticos y, las del tipo de la quimotripsina rompen los enlaces de aminoácidos aromáticos.

En las enzimas bacterianas se ve influida asimismo la eficacia específica por el medio de cultivo y los cultivos madres utilizados para la obtención de dichas enzimas, de modo que se produce un cambio de la especificidad del substrato de generación a generación, y no es posible obtenerse casi nunca productos enzimáticos de calidad constante.

El presente invento tiene por objeto proporcionar un procedimiento para la obtención de enzimas hidrosolubles y exentas de inhibidores, que son especialmente adecuadas para el empleo en composiciones detergentes, siendo capaces de hidrolizar toda la materia proteínica presente en la ropa en calidad de suciedad, incluso en presencia



de otras sustancias orgánicas. Es otro objeto del presente invento proponer asimismo composiciones detergentes nuevas de gran actividad, que no ofrezcan los inconvenientes de las composiciones detergentes conocidas que contienen enzimas. Un objeto todavía más del invento es proporcionar un procedimiento para fabricar estas composiciones detergentes, que consiste en incorporar las enzimas a la composición, detergente sin pérdida de actividad.

Para la solución de este problema no es, por lo tanto, sustancial únicamente el procedimiento para la obtención de las enzimas apropiadas, sino que hay que emplear también ciertas clases de sustancias de actividad superficial para conseguir el efecto deseado. Aparte de esto es ventajoso agregar a las composiciones detergentes determinadas sustancias adicionales, con objeto de mejorar la actividad enzimática y, en especial, la capacidad de almacenaje de las composiciones detergentes que contienen enzimas. Asimismo hay que cuidar de que las otras sustancias adicionales normalmente usadas en composiciones detergentes, tales como abrillantadores y perfumes, no influyan de manera perjudicial en la actividad enzimática.

Estos objetos son conseguidos según el invento, por medio de un procedimiento para la obtención de enzimas fácilmente hidrosolubles, exentas de inhibidores, que sean apropiadas en especial para el uso en composiciones detergentes, procedimiento que comprende triturar páncreas animal en especial páncreas de cerdo, eventualmente junto con otros materiales intestinales que ha sido congelado inmediatamente después de sacrificado extraer el material con un alcohol que contiene 1 - 2 átomos de carbono, por ejem-



plo, alcohol metílico ó etílico, tratar el extracto con un disolvente líquido insoluble en agua, tal como alcohol butílico tal como alcohol n-butílico, ó con un éter, tal como éter dietílico y, precipitar la enzima a partir de la capa transparente que se forma, con un disolvente hidrosoluble, que es un alcohol que contiene 1 - 2 átomos de carbono tal como alcohol metílico ó etílico, o con una cetona hidrosoluble, por ejemplo acetona, a temperaturas inferiores a 10°C, y recuperar la enzima.

La extracción puede llevarse a cabo con el alcohol de 1 - 2 carbonos per se ó con alcohol acuoso. El disolvente hidrosoluble empleado para la precipitación de la enzima, puede ser utilizado al mismo tiempo ó a continuación del tratamiento con el disolvente no soluble en agua.

El disolvente de precipitación hidrosoluble puede ser empleado per se, ó bien en solución acuosa, si se utiliza después del tratamiento con el disolvente no soluble en agua.

La enzima así obtenida, que consiste sustancialmente en tripsina, está exenta de inhibidores, es fácilmente hidrosoluble y apropiada especialmente para su empleo en composiciones detergentes.

El procedimiento preferido comprende las siguientes etapas: mezclar el material de páncreas, triturado hasta un tamaño de partícula inferior a 4 mm. con una cantidad 2,5 a 6 veces mayor de una solución acuosa de etanol del 15 al 35 %, después dejar reposar la mezcla durante 10 a 15 horas a temperatura ambiente, filtrar, eventualmente después de la adición de agentes auxiliares para la filtración, añadir al filtrado, eventualmente después de añadir más agua, de 10 a 20 partes en peso de alcohol butílico



por cada 100 partes en peso del producto filtrado, después del filtrado dejar reposar durante 10 a 15 horas, separar la capa transparente formada, añadir aproximadamente las mismas partes en volumen de etanol, y recuperar mediante  
5 filtración la enzima precipitada después de dejar reposar 2 a 8 horas a temperaturas de entre +1 y 10° C, y que consiste sustancialmente en tripsina.

En este procedimiento es conveniente secar con acetona el residuo del producto de la extracción con alcohol etílico que consiste sustancialmente en pancreatina.  
10 Los sólidos así obtenidos se pueden agregar asimismo en pequeñas proporciones a composiciones detergentes en calidad de componente enzimáticamente activo.

Es ventajoso asimismo mezclar la enzima ó mezcla de enzimas obtenida de este modo, que consiste sustancialmente en tripsina o/y pancreatina, con aproximadamente partes iguales de lactosa. La adición de la lactosa mejora eficazmente la capacidad enzimática y, sobre todo, la estabilidad de la enzima.  
15

Se ha encontrado asimismo que se obtienen preparados enzimáticos apropiados especialmente para su empleo en composiciones detergentes cuando la enzima o mezcla de enzimas consistente sustancialmente en tripsina y/o pancreatina, se mezcla con una cantidad 3 a 4 veces mayor de  
20 una sal inorgánica tal como sulfato sódico, bicarbonato sódico y/o un fosfato neutro.

Finalmente se ha descubierto que las enzimas ó mezclas de enzimas obtenidas por los procedimientos citados, únicamente desarrollaran totalmente su capacidad,  
25 cuando las composiciones detergentes contienen de 5,0 has-



ta 20 % en peso de sustancias no iónicas de actividad superficial, y 95 a 80 % en peso de mejoradores de detergencia. De acuerdo con el invento se agregan a estas composiciones detergentes de 0,1 a 0,6 % en peso de las enzimas  
5 ó mezclas de enzimas obtenidas por el procedimiento conforme al invento.

Mejoradores de detergencia apropiados para un agente de lavado previo conforme al invento, consisten en 40 a 70 partes en peso de sulfato sódico anhidro, 10 a 30  
10 partes en peso de pirofosfato tetrasódico, 10 a 15 partes en peso de perpirofosfato sódico y 5 a 10 partes en peso de pirofosfato ácido de sodio.

Mezclas de mejoradores de detergencia adecuadas para composiciones detergentes de lavado principal o aclarado, consisten sustancialmente en 10 a 20 partes en peso  
15 de un pirofosfato sódico neutro y 5 a 10 % en peso de un pirofosfato ácido sódico, 10 a 20 partes en peso de polifosfato sódico, 10 a 20 partes en peso de perpirofosfato sódico, 10 a 20 partes en peso de bicarbonato sódico y 30  
20 a 50 partes en peso de sulfato sódico.

Especialmente ventajoso es que las composiciones detergentes conforme al invento contengan, con relación a las enzimas o mezclas de enzimas agregadas, una  
cantidad 5 a 10 veces mayor de carboximetilcelulosa, que  
25 es un conocido agente de suspensión de la suciedad que mantiene la actividad de las enzimas y/o mezclas de enzimas en la lejía de lavado, y actúa como coloide protector.

Convenientemente las enzimas o mezclas de enzimas usadas en las composiciones detergentes conforme al  
30 invento contienen de 10 a 20 partes en peso de una tripsi-



14-10-1970

na fácilmente hidrosoluble, preparada según el método del  
invento, mezclada preferentemente con 50 a 60 partes en  
peso de lactosa y 5 a 25 partes en peso de pancreatina,  
0,05 a 1 partes en peso de ureasa y 70 a 90 partes en pe-  
5 so de una sal inorgánica.

Tal combinación de enzimas obtenida por el proce-  
dimiento conforme al invento y que consiste sustancialmen-  
te en tripsina mezclada con lactosa, y además de ureasa  
y/o pancreatina, posee una gama de actividad suficiente  
10 requerida para composiciones detergentes.

La ureasa empleada en esta composición detergen-  
te es preferentemente una ureasa que se precipita con ace-  
tona a bajas temperaturas a partir de una solución dializa-  
da de alcohol etílico acuoso y del extracto de una harina  
15 de soja previamente desengrasada.

El procedimiento del invento para la fabricación  
de estas composiciones detergentes comprenden primeramente  
preparar una mezcla de los agentes tensioactivos y los me-  
joradores de detergencia secar esta mezcla y luego agre-  
20 gar la enzima ó la mezcla de enzimas ó pulverizarla sobre  
la mezcla seca.

A continuación será explicado el invento con más  
detalle mediante los siguientes ejemplos.

25 Ejemplo 1

Para la obtención de tripsina fácilmente hidro-  
soluble, exenta de inhibidores, se congelaron a  $-15^{\circ}$  C  
50 kg. de glándulas de páncreas de cerdo recién sacrifi-  
cado. Al cabo de un tiempo de congelación de 24 horas se  
30 hizo pasar este material, en estado congelado, a través de



un dispositivo triturador, por ejemplo, por una máquina de picar carne con un disco perforado con agujeros de 3 a 5 mm. de diámetro. Al material de páncreas triturado se colocó en un recipiente fueron añadidos 50 kg. de alcohol etílico al 95 % y 150 litros de agua de la cañería; la mezcla se agitó lentamente durante 30 minutos, evitando la formación de una emulsión, y después se dejó reposar en el recipiente tapado, durante 12 a 13 horas a temperatura ambiente.

Los ensayos con otros disolventes, tales como alcohol isopropílico, proporcionan resultados menos favorables, ya que se varia desfavorablemente la estructura proteínica de la enzima, así como los lugares de contacto de la enzima y, con ello se reduce su actividad.

Después de un tiempo de envejecimiento que dura al menos 12 horas, se agregan a la mezcla 5 kg. de tierra de diatomeas y se agita lentamente, con lo que las fibras de páncreas adoptan al cabo de un corto tiempo el aspecto de cordones. Una vez que ha sido alcanzado esta etapa, se hace pasar toda la carga a través de un tamiz fino, para separar el material de fibras de páncreas, del jugo turbio de páncreas. El material de fibras de páncreas puede seguir exprimiéndose con un filtro-prensa, reuniendo el jugo prensado así obtenido, con el jugo turbio de páncreas. Se obtienen aproximadamente 130 litros de jugo de páncreas y, calculado como sustancia seca, 20 kg. de material de fibras de páncreas. El jugo de páncreas se completa con agua hasta obtener 200 litros de líquido, y se mezcla con 15 partes en peso de alcohol butílico por cada 100 partes en peso de jugo; esta mezcla se agita a fondo durante



aproximadamente 5 minutos, y luego se deja reposar 12 horas a temperatura ambiente. Con ello se forma una capa transparente y una capa turbia, que contiene sustancialmente residuos de fibras y proteínas extrañas. La capa transparente se separa por succión cuidadosamente, se mezcla con 1,15  
5 litros de alcohol etílico por cada litro de solución transparente, y luego se envejece a +5° C durante 6 horas, durante cuyo tiempo tiene lugar la precipitación de tripsina exenta de inhibidores de la tripsina. Al cabo de un tiempo  
10 de envejecimiento de aproximadamente 6 horas, se filtra la carga a través de un filtro de vacío ó un embudo Buchner, obteniéndose un total de 650 g. (con relación al peso en seco) de tripsina purísima, fácilmente hidrosoluble y exenta de inhibidores. Un análisis de esta sustancia demostró  
15 que esta tripsina contenía aproximadamente de 450 hasta 500 unidades Wilstätter por cada gramo de sustancia. A partir del filtrado, consistente sustancialmente en butanol, alcohol etílico y agua, pueden recuperarse sin dificultades el alcohol butílico y el alcohol etílico.

20 El material de fibras de páncreas obtenido después de la extracción con alcohol etílico y exprimido en el filtro-prensa, se agita con acetona en una proporción en peso de 1 : 5, y se deja reposar aproximadamente durante  
25 10 minutos. Al cabo de este tiempo la mezcla se hace pasar a través de un filtro o de un tamiz y el residuo se seca al aire y se muele. Con ello se obtienen aproximadamente  
30 6 kg. de pancreatina pura que, por cada gramo de sustancia, contiene 20 unidades de lipasa, 40 unidades de tripsina y 60 unidades de quimotripsina (medidas por el método de Wilstätter).



### Ejemplo 2

La tripsina seca, hidrosoluble y exenta de inhi-  
bidores, obtenida conforme al ejemplo 1, se estabilizó mez-  
5 clandola con lactosa en una proporción en peso de 45 : 55;  
a continuación se mezcló esta mezcla con una sal inorgáni-  
ca en una proporción en peso de 15 : 85. Esta mezcla o pre-  
paración facilita el manejo de la tripsina activa muy concen-  
trada, lo que representa una ventaja especial en la mezcla  
10 ulterior con otros componentes del detergente.

Como sal inorgánica se puede emplear sulfato só-  
dico exento de hierro, fosfatos neutros, tal como, por  
ejemplo, pirofosfato sódico, o bicarbonato sódico. La mez-  
cla así obtenida puede ser agregada en cantidades de 0,1  
15 hasta 0,5 % en peso a las composiciones detergentes, que  
preferiblemente contienen de 5 a 20 % en peso de detergen-  
tes no iónicos, y 95 a 80 % en peso de mejoradores de deter-  
gencia.

### Ejemplo 3

20

Un preparado enzimático que es especialmente  
apropiado para composiciones detergentes que, a causa de  
su contenido en tripsina, elimina manchas a base de protei-  
na y que a efectos de eliminar manchas que contengan urea,  
25 contiene además ureasa y, asimismo lipasa, para eliminar  
manchas basadas en grasa, se prepara de la manera siguien-  
te:

A) Para la obtención de la ureasa se muelen a  
la forma de harina habas de soja o habas de soja grosera-  
30 mente molidas en un molino de crucetas de percusión, harina



que se desengrasa mediante percolación con una cantidad aproximadamente diez veces mayor de tricloroetileno. 10 kg. de esta harina de soja, desengrasada, secada al aire y vuelta a moler, se agitan durante una hora con 40 litros de una solución acuosa de alcohol etílico al 27 %. Después de un tiempo de envejecimiento de 12 horas, se filtra el material obteniéndose aproximadamente 17 litros de producto filtrado. El residuo se vuelve a agitar nuevamente con 25 litros de alcohol etílico al 27 %, durante una hora, y seguidamente se filtra. Este segundo producto de filtración, obtenido en una cantidad de 19 litros, y el primer producto filtrado, de 17 litros, se juntan se dializan en una manguera de dialización de aproximadamente 20 cm. de diámetro, en porciones de 2 litros y cada una de ellas durante 2  $\frac{1}{2}$  horas, en contracorriente con el agua de la cañería. La solución dializada se enfría hasta 0° C y se precipita con partes del mismo volumen de acetona a -5° C. Al cabo de 2 a 3 horas se decanta el líquido transparente y el precipitado se separa en una centrífuga de vasos y se seca lavado con acetona de -5° C.

También se puede, una vez separado el líquido transparente, pulverizar el líquido residual, con el precipitado, sobre una sal portadora, por ejemplo, sobre un sulfato sódico exento de hierro.

Por el procedimiento anterior se obtuvieron en total 350 g. de ureasa totalmente exenta de inhibidores de tripsina, con aproximadamente 250 unidades por cada gramo de sustancia.

B) Para la obtención del cuerpo enzimático mixto apropiado se mezclaron 100 g. de la ureasa así obtenida



con 10.000 g. de pancreatina obtenida de acuerdo con el ejemplo 1 a partir del residuo de extracción etérea, y 5.000 g. de tripsina aislada conforme al ejemplo 1 y mezclada con aproximadamente partes iguales en peso de lactosa, y 67.900 g. de sal inorgánica neutra, en el presente caso con sulfato sódico exento de hierro. Este cuerpo enzimático resultó especialmente apropiado en calidad de aditivo para composiciones detergentes y puede agregarse en cantidades de 0,1 hasta 1,0% en peso.

10 Ejemplo 4

Para la obtención de una tripsina estable, exenta de inhibidores e hidrosoluble, se mezclaron durante 40 minutos 10 kg. de glándulas de páncreas triturado con 7,5 litros de alcohol metílico, hasta que se obtiene una mezcla homogénea. Se agregaron aproximadamente 7,5 litros de agua a la mezcla; la mezcla fué agitada lentamente durante un periodo de aproximadamente 10 minutos y seguidamente se dejó reposar durante un periodo de aproximadamente 24 horas temperatura ambiente de 25°C. Después de esta extracción se filtró la mezcla, obteniéndose 16,5 litros de extracto transparente. Este extracto se enfrió hasta una temperatura de aproximadamente 0°C. y a continuación se añadió una mezcla de 8 litros de acetona y 8 litros de éter etílico. Al cabo de 15 horas se decantó el líquido sobrenadante, después de lo cual el precipitado residual de la enzima, de aspecto de jarabe se mezcló con aproximadamente 2 litros de alcohol etílico. Con ello se formó un precipitado blanco lechoso, que fue filtrado con succión y se lavó con 800 ml de acetona. El precipitado lavado se secó al aire sobre un filtro a temperatura ambiente con lo que se obtuvieron 680 g.



14

de tripsina hidrosiluble pura. Un análisis mostró una actividad de 440 a 460 unidades Willstätter.

Ejemplo 5

5 Se repitió el método del ejemplo 4, con la excepción de que se empleó páncreas de bovino como material de partida. Se obtuvieron aproximadamente 590 g. de tripsina con una actividad de 220 unidades Willstätter.

Ejemplo 6

10 Se repitió el método del ejemplo 4, con la excepción de que se precipitó la enzima con una mezcla 1:1 de alcohol n-butílico y alcohol metílico. Se obtuvieron aproximadamente 540 g. de tripsina con una actividad de 520 a 530 unidades Willstätter.

Ejemplo 7

15 Se preparó un agente de lavado previo mezclando con agitación lenta

25 kg. de poliglicoléter de amida de ácido graso

75 kg de poliglicoléter de alcoholifenol

50 kg. de agua

20 1,0 kg. de abrillantador óptico

para formar una suspensión; el abrillantador óptico fué añadido al final del procedimiento de mezclado.

25 El poliglicoléter de amida de ácido graso ("Dionil W 100") tenía una viscosidad de 15 a 20<sup>o</sup>E, ó respectivamente de 120 a 160 cp a 50<sup>o</sup>C; el poliglicoléter de alcoholifenol ("Marlophen 8/4") tenía una tensoactividad de 36,3 41,5 dyn/cm a 22<sup>o</sup>C, 1 g/1, medida por el método de presión de burbuja. Como abrillantador se empleó una mezcla de "Tinopal CH 3584" y "Tinopal RB 8 200" a partes iguales en peso.

30



La solución así obtenida se pulverizó en un tambor mezclador sobre una mezcla de mejoradores de detergencia que tenían la composición siguiente:

- 200 kg. de pirofosfato tetrasódico neutro
- 5 50 kg. de pirofosfato ácido de sodio
- 100 kg. de perpirofosfato sódico con un contenido de 10% de  $H_2O_2$
- 20 kg. de carboximetilcelulosa
- 480 kg. de sulfato sódico anhidro.

10 Después de terminada de pulverizar la solución de sustancias tensioactivas sobre los mejoradores de detergencia y después de que la mezcla estaba totalmente seca, se agregaron de 1 a 3 kg. del cuerpo enzimático preparado conforme al ejemplo 3.

15 Las sustancias aromáticas pueden agregarse bien a la solución ó bien por separado al final del proceso de mezclado, adecuadamente las sustancias olorosas se fijan primero a cera de óxido de etileno hidrosoluble. Las sustancias olorosas preferidas son productos que no contienen  
20 terpenos ni hidrocarburos de cadena ramificada.

Con respecto a los fosfatos empleados, es recomendable emplear fosfatos pulverizados, ya que éstos presentan una capacidad de absorción especialmente buena para los  
25 detergentes no iónicos en el procedimiento de nebulización proporcionando un polvo seco susceptible de fluir. Debe entenderse que también pueden agregarse cualesquiera otros aditivos usuales para las composiciones detergentes.

La composición detergente se ajusta adecuadamente a un pH no superior a 8,4, medido en una solución de detergente al 1% a 60°C.  
30





seco, se agregan, aproximadamente 1 a 3 kg. del cuerpo enzimático conforme al ejemplo 4, dependiendo la cantidad de enzima del uso previsto para la composición detergente.

El valor del pH de una solución de detergente al 1 % no debe, a 60° C, sobrepasar un valor de 8,8. Eventualmente se puede correr el valor pH en dirección al intervalo ácido, mediante la adición de pirofosfato sódico, y en dirección al intervalo neutro, por adición de ácido láctico comercial.

10

Ensayos comparativos

Ensayos de lavado con las composiciones detergentes obtenidos conforme al invento, utilizando un tiempo de lavado reducido y a temperaturas de lavado de hasta 60° C, se comprobó una eliminación mucho mejor de las manchas que la obtenida con composiciones detergentes enzimáticas hasta ahora conocidas. Especialmente ventajoso resultó el efecto de las composiciones detergentes conforme al invento sobre las propiedades mecánicas de los tejidos tratados.



Producto	Nº de operaciones de lavado	Pérdida de resistencia al desgarramiento en %	Pérdida de resistencia a la tracción en %	Contenido de cenizas %	
5	Producto comparativo comercial 1	5	3,28	6,67	1,2
		10	6,67	14,9	1,8
		20	11,85	25,3	2,4
10	Producto comparativo comercial 2	5	3,58	5,25	0,7
		10	5,95	13,2	1,6
		20	11,78	26,2	2,6
15	Producto conforme al Ejemplo 5	5	2,65	4,2	0,1
		10	3,28	5,15	0,25
		20	7,98	14,25	0,40

En general se ha encontrado que, cuando se emplean los productos conforme al invento, se consigue un efecto de lavado total a temperaturas sustancialmente más bajas, y con mucha menos sustancia de lavado. Asimismo se provoca un abrillantado uniforme de la colada, a saber, independientemente de los tejidos que es independiente del respectivo material textil tal como celulosa, algodón, lana, seda ó fibras de poliamida. Aparte de esto el tejido es mucho menos atacado como lo que demuestran los valores mejores de resistencia al desgarramiento y resistencia a la tracción. También el contenido de cenizas fué mucho menor, lo que demuestra que la composición detergente del invento puede ser eliminada del tejido mucho más fácilmente mediante el aclarado, no permitiendo se formen depósitos responsables de que el tejido adquiera un color amari-



lento.

En contraposición a los productos obtenidos por los procedimientos de fabricación conocidos, las enzimas obtenidas de acuerdo con el invento, en especial la tripsina y la ureasa, son sustancialmente hidrosolubles, con lo que se alcanza una distribución uniforme de las mismas en la composición detergente, así como en la solución de lavado.

Las enzimas obtenidas conforme al invento están exentas asimismo de inhibidores naturales de las enzimas, cuya eliminación no se consigue totalmente por los procedimientos conocidos.

Por el procedimiento del invento resulta posible eliminar el inhibidor de la tripsina a base de habas de soja, de modo que ahora ya se puede emplear la tripsina junto con la ureasa, sin reducir con ello la actividad de la tripsina.

La influencia de inhibidores naturales de las enzimas, que pueden estar presentes en la suciedad de la ropa, se compensa por la alta inmunidad y actividad, respectivamente, de las enzimas obtenidas de acuerdo con el invento.

El número de bacterias de las enzimas obtenidas conforme al invento es del orden de aproximadamente  $10^1$  el número de bacterias de las proteinasas bacterianas es, por el contrario, de  $10^{20}$  hasta  $10^{40}$ . Una enzima obtenida conforme al invento no representa, por consiguiente ningún peligro de infección originado mediante el proceso de lavado.

En resumen, la Patente de Invención que se soli-



cita deberá recaer sobre las siguientes.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana el 19 de Marzo de 1.969 con el número 19 13 869.3 (parcial), se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

REIVINDICACIONES

15 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:

20 1.- Un procedimiento para la obtención de enzimas fácilmente hidrosolubles y exentas de inhibidores, que comprende triturar páncreas animal que ha sido congelado inmediatamente después de sacrificadas las reses, extraer dicho material con un alcohol que contiene 1-2 átomos de carbono, tratar dicho extracto con un disolvente líquido insoluble en agua seleccionado del grupo que consiste en un alcohol butílico y un éter, hacer que precipite dicha enzima desde la capa transparente resultante con un disolvente hidrosoluble seleccionado del grupo que consiste en un alcohol que contiene 1-2 átomos de carbono y una cetona a una temperatura inferior a 10°C, y recuperar la enzima.

25  
30

2.- Un procedimiento de acuerdo con la rei-



vindicación 1, caracterizado porque el disolvente hidró soluble empleado para precipitar la enzima, se utiliza junto con ó al mismo tiempo que el disolvente no soluble en agua.

5                    3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende mezclar el material de páncreas triturado a un tamaño de partícula inferior a 4 mm. con una cantidad 2,5 a 6 veces mayor de una solución acuosa de alcohol etílico del  
10                    15 al 35 % y, después dejar reposar la mezcla durante 10 a 15 horas a temperatura ambiente pasarla a través de un filtro, eventualmente después de la adición de un agente auxiliar de filtración, añadir al filtrado, eventualmente después de añadir más agua, de 10 a 20  
15                    partes en peso de alcohol butílico por cada 100 partes en peso de jugo, dejar reposar el filtrado durante 10 a 15 horas, separar la capa transparente formada, añadir aproximadamente partes iguales en volumen de etanol, y recuperar mediante filtración la enzima precipitada después de 2 a 8 horas a temperaturas de entre  
20                    +1 y 10° C, y que contiene sustancialmente tripsina.

25                    4.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado porque comprende extraer con acetona el residuo de la extracción con alcohol etílico y secar el producto que, sustancialmente, consiste en pancreatina.

30                    5.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado porque comprende mezclar la enzima que consiste esencialmente en tripsina con cantidades aproximadamente iguales de lactosa.

27.7.72

5-1 AGO. 1972

5 6.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la mezcla de enzima, consistente sustancialmente en tripsina y lactosa se mezcla con una cantidad tres o cuatro veces mayor de una sal inorgánica, tal como sulfato sódico, hidrogeno carbonato sódico y/o un fosfato neutro.

7.- Un procedimiento para la obtención de enzimas.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para fines que se han especificado.

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

Madrid,

5-1 AGO. 1972

P.A.

Alberto de Eizaburu  
Por Poderes

377 175