

380768

28 SET



P- 45.042

F-1586 D
Div.

SECCION TECNICA
CLASIFICACION
Clase <u>C07 C11</u>
SUBCLASE <u>G D</u>

Memoria descriptiva

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, Japon.

por: "UN METODO PARA PREPARAR UN AGENTE DE LIMPIEZA
QUE CONTIENE UNA PROTEASA ALCALINA"

(Clase Internacional C08g, C11d)

380768

15 JUN 1970



La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto detergente u otro agente de limpieza que contiene una proteasa alcalina.

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 tensioactivos y/o agentes formadores de quelatos, lo que sugeriría su posibilidad de aplicación en el campo de la industria de detergentes.

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

20 A este respecto, se han efectuado también estudios amplios, y se han 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, la enzima será denominada simplemente "proteasa alcalina".

380768



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 de 10,0 a 11,5.

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

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 genero Gibberella.
10 Algunos microorganismos típicos que producen la proteasa alcalina son los siguientes:

	<u>Fusarium oxysporum</u>	(IFO 5942)
	<u>Fusarium oxysporum</u> , fam. <u>batatas</u>	(IFO 4468)
15	<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)
	<u>Fusarium solani</u>	(IFO 5232)
20	<u>Fusarium</u> , esp. S-19-5	(IFO 8884)
	<u>Gibberella fujikuroi</u>	(IFO 5268)
	<u>Gibberella saubinetii</u>	(IFO 6608)

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

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 fué aislada a partir de una muestra de tierra por los solicitantes de la Patente de la
30 presente invención, y tiene las siguientes características

380768



microbiológicas:

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

- 5 1. Caldo de malta:
Buen desarrollo, blanco; se forma película flocculante; reverso rugoso; pigmento escarlata-púrpura en el medio.
- 10 2. Agar de malta:
Buen desarrollo, blanco y flocculante; hifas aéreas abundantes; reverso rugoso; un pigmento escarlata-púrpura en el medio.
- 15 3. Disolución de Czapek:
Buen desarrollo, blanco; se forma película flocculante; reverso rugoso; ningún pigmento sustancialmente.
- 15 4. Agar de Czapek:
Buen desarrollo, blanco y flocculante; reverso rugoso; sustancialmente ningún pigmento.
- 20 5. Gelatina:
Buen desarrollo, blanco y flocculante; pigmento púrpura negruzco oscuro en el reverso; licuefacción débil.
- 25 6. Dextrosa de patata:
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 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

5.6.70

380768 13



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 clamidos-pora, pero a veces está presente.

5 (3) Características fisiológicas.

1. Condiciones para el desarrollo.

Concentración de iones hidrógeno: se desarrollan preferiblemente en medios alcalinos, óptimamente a pH entre 8,0 y 9,0. Temperatura: óptima, 24°C
10 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.

15 3. Utilización de alcohol etílico:

Negativa.

4. Degradación de pectina:

Muy ligera.

5. Degradación de tanino:

20 Negativa.

6. Degradación de grasas y aceites:

Positiva

7. Utilización de hidratos de carbono:

Utiliza maltosa, galactosa, melibiosa, sacaro-
25 sa, trehalosa, fructosa, manosa, rafinosa, dextrina, almidón, glucosa y lactosa. Utiliza ligeramente inulina, xilosa, arabinosa y celu-
losa.

Según el "Diccionario de los Hongos" (G.C. Ainsworth,
30 5ª edición), las características microbianas citadas indi-



can que esta cepa particular pertenece al género Fusarium, familia Tuberculariáceas, orden Moniliales, suclase Deuteromicetos, clase Fungi Imperfecti.

5 Según la clasificación de Snyder y Hansen, los Fusarium están divididos, como sigue, en las Secciones A_1 y A_2 :

A_1 : se forman microconidios, usualmente de una célula.

10 A_2 : no se forman microconidios o se producen raramente, con forma de huso, de coma o de riñón, de una a varias células.

15 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.

20 El organismo Fusarium es. 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.

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

30 Siempre que pueda desarrollarse sobre él un microor-

380768 13 JU



ganismo productor 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, materiales 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 compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos. Como sales inorgánicas, pueden ser incorporados varios fosfatos, sulfatos y clorhidratos, por ejemplo. En ciertas circunstancias pueden ser añadidas, con el fin de estimular el desarrollo de los microorganismos, varias vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos y sus compuestos análogos, etc. Según los métodos de cultivo y las condiciones a emplear, 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 enzima.

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.

Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura y tiempo de incubación, pH del medio, velocidad 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 con



diciones preferidas incluyen una temperatura de incubación de desde 20°C 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.

5 Así pues, el microorganismos 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.

10

 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.

15

 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

20

25

30



de iones, etc; cromatografía empleando un derivado de celulosa, por ej. dietilaminoetil 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 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 puede ser utilizadas como ingredientes de los productos limpiadores o detergentes.

Como ejemplos de los agentes tensioactivos contenidos en los productos detergentes pueden indicarse varios compuestos, que incluyen los agentes tensioactivos 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 (DAE), olefina-sulfato, n-alfa-olefina sulfonato (AOS), tetrapropilbenceno sulfonato (ABS), y n-alcohol benceno sulfonato (IAS); y agentes tensioactivos no iónicos bien del tipo de éter o del tipo de éster, tales como los éteres de polioxietileno y alcohilo, los éteres de polioxietileno y alcoholfenol, los ésteres de alcohol polivalente y alcohilo, los ésteres de polioxietileno alcohilo, ésteres de azúcar, y similares.

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

La proteasa alcalina es mezclada con otros componentes del producto, que pueden encontrarse en forma pulverulenta, granular o líquida, y, cuando la mezcla resultante es un líquido, puede ser secada hasta obtener 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).

380768 13



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
5 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
10 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
15 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
20 tipo de producto. En el caso de un detergente 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.

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

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



En el prelavado, los materiales manchados son usualmente empapados en una disolución de detergente a 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, durante una hora aproximadamente.

En los ejemplos siguientes se muestran realizaciones preferidas de la invención, pero no han de ser considerados como limitativos de la presente invención.

A lo largo de toda la memoria descriptiva, las abreviaturas "ml", "mg", "µg", "µ", "m/µ" y "°C" significan mililitro(s), 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 relacionadas con las partes en volumen de igual manera que los gramos con los mililitros. En los dibujos, E representa energía, λ longitud de onda, N número de onda, T transmitancia, Ar actividad relativa, t temperatura y Ad actividad residual:

Ejemplo 1

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, inóculadas con *Fusarium*, cepa S-19-5 (IFO 8884) e incubadas a 28°C durante 5 días, bajo aireación y agitación, para preparar un cultivo de siembra.

El cultivo de siembra es inculado a un fermentador

380768 28 S

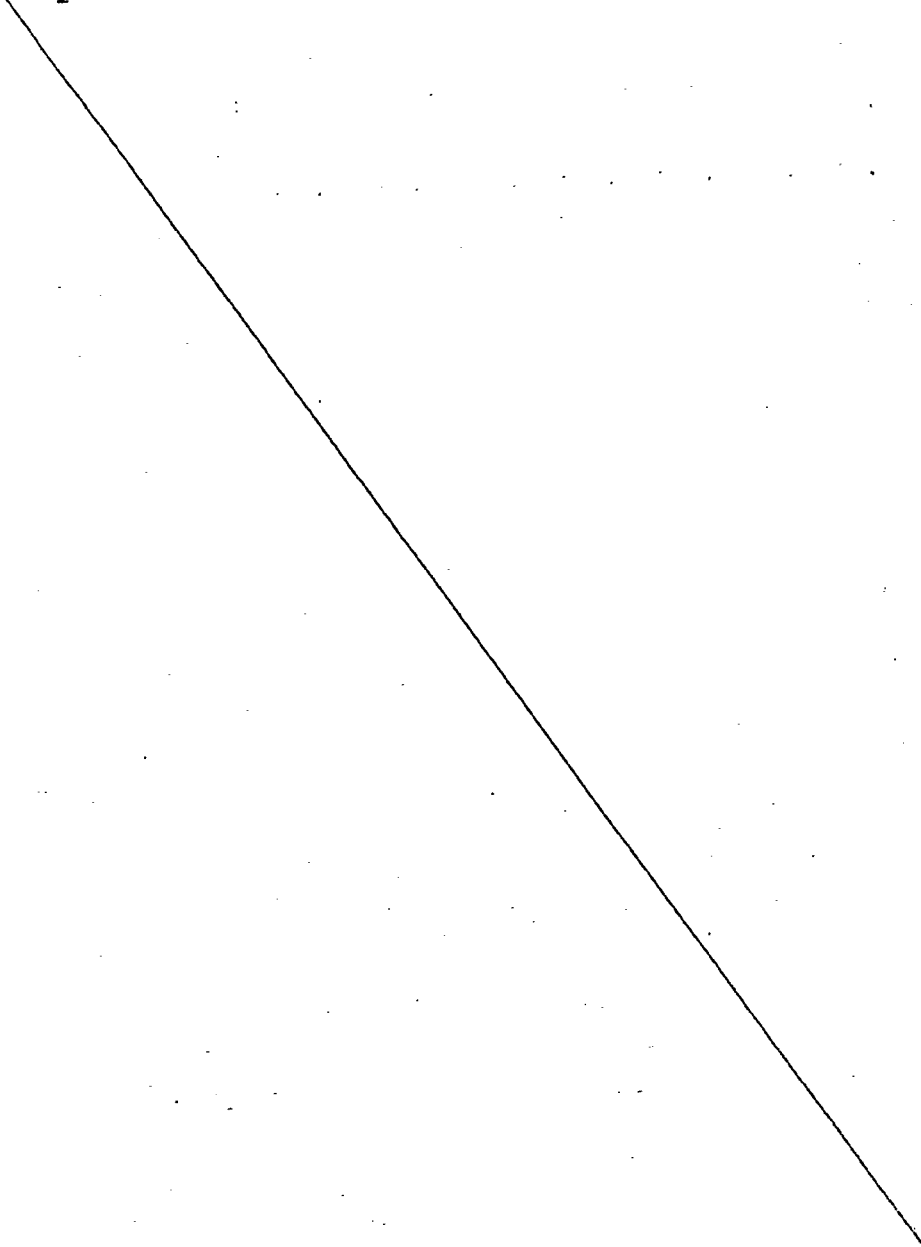


(cuya capacidad es de 50.000 partes en volumen) que contiene 30.000 partes en volumen del mismo medio líquido anterior, y el fermentador es sometido a incubación a 25°C durante 144 horas, con una velocidad de aireación de 45.000 partes en volumen por minuto, con agitación a 500 rev./minuto. Durante la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

5

10

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



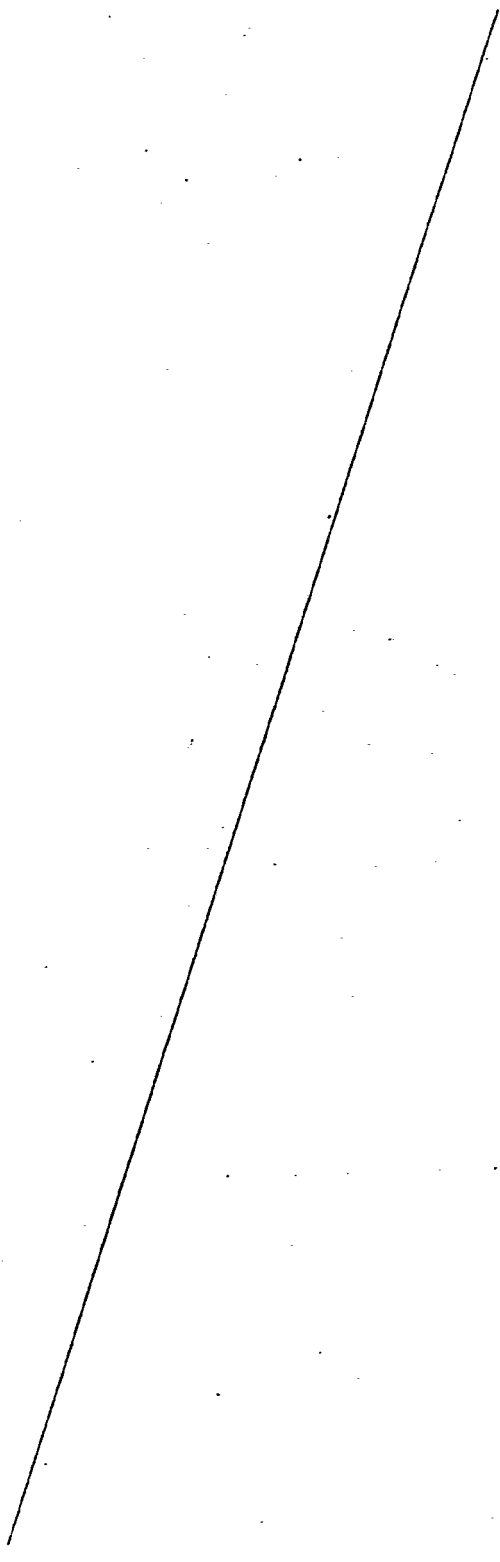
2000

380768

23 S



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



380768



13 J

Ejemplo 2

5 El cultivo obtenido después de 144 horas, según el
Ejemplo 1, es enfriado hasta aproximadamente 5°C, y des-
pués es hecho pasar a través de un filtroprensa con el auxi-
liar 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 se-
parado por salificación es recogido por filtración con el
10 auxiliar de filtración. El precipitado resultante de sulfa-
to de amonio que contiene el auxiliar de filtración es di-
suelto en aproximadamente 6.000 partes en volumen de agua
fría, y los materiales insolubles son separados por filtra-
ción. Después es añadido al filtrado sulfato de amonio -
15 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 diagrama de piel de pez durante 4 días,
y liofilizada, dando un polvo de enzima cruda. Por el pro-
cedimiento anterior se obtienen 30 partes en peso de pol-
20 vo de la enzima cruda, con un color parduzco. La actividad
específica de esta muestra es de aproximadamente 980 UP/mg.

Ejemplo 3

25 En 3.000 partes en volumen de agua fría son disuel-
tas 30 partes en peso del polvo de enzima cruda preparado
en el Ejemplo 2, y los materiales insolubles de la disolu-
ción de enzima son separados por filtración con el auxiliar
de filtración, obteniéndose una disolución transparente.
Es añadido sulfato de amonio 0,6-saturado al líquido de fil



tración transparente, dando un precipitado de la enzima, que después es disuelto de nuevo en 1.500 partes en volumen de agua fría, decolorado 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 peso de un polvo de enzima parcialmente purificado, con una actividad específica de 1580 UP/mg.

4,5 partes en peso del polvo de enzima, disueltas 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 dietilaminoetil 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 polvo. Por el procedimiento anterior se obtienen 0,35 partes de enzima purificada en estado pulverulento, con una actividad específica de 5.400 UP/mg.

0,35 partes en peso del polvo de enzima purificada, disueltas en 335 partes en volumen de tampón de Tris-ClH 0,01 M, de pH 8,0, son cromatografiadas a través de una columna de Sephadex G-100, lavado previamente 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 obtienen 0,15 partes en peso de un polvo de enzima altamente purificada. La actividad específica de esta muestra es de 6.500 UP/mg.

Las características enzimológicas de esta muestra

380768 13



son las siguientes:

- (1) Color y forma:
Polvo blanco.
- (2) Análisis elemental típico (%):
5 C, 46,72; H, 6,59; N, 15,03.
- (3) Constante de sedimentación (S_{20w}):
aproximadamente $3,19 \times 10^{-13}$
- (4) Peso molecular (por el método de Archibald):
 $2,65 \times 10^4$ ($\pm 5\%$)
- 10 (5) Espectro de absorción ultravioleta (véase Fig. 1):
Absorción máxima a 275-280 milimicras; $E_{280}^{1\%}$ milimicras, = 7,0
1 cm.
- (6) Espectro de absorción infrarroja (véase Fig. 2):
15 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):
A pH aproximadamente 11
- (8) Solubilidad:
20 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.
- (9) Actividad de pH (véase Fig. 3):
25 pH óptimo a aproximadamente 11.
- (10) Actividad de temperatura (véase Fig. 4):
Temperatura óptima, a aproximadamente 50°C.
- (11) Estabilidad según pH (véase Fig. 5):
30 No hay desactivación en el intervalo de pH a 5 a 8; 10% de desactivación a pH 11,5 (1 hora de incubación a 37°C)



(12) Estabilidad en función de temperatura (véase Fig. 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).

5

Ejemplo 4

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

10

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-C₁₅₋₁₈ (NS), n-C₁₂-alcohilsulfato de sodio (DAS), n-alfa-olefina de C₁₅₋₁₈ sulfonato de sodio (AOS), tetrapropilbencenosulfonato de sodio (ABS) y n-C₁₂-alcoholbencenosulfonato de sodio, y estos detergentes resultantes son denominados NS-, DAS-, AOC-, ABS- y LAS-, respectivamente.

15

Tabla 1

20

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

25

30

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

5.6.70



380768 28 SE

el Ejemplo 2 en 100 ml. de tampón 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.

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

Tabla 2

Tipo de detergente añadido	Actividad de proteasa (UP/ml.)	Actividad relativa [#]
Ninguno	19,6	100
HS	20,0	102
DAS	19,2	98
AOS	19,4	99
ABS	19,2	98
LAS	19,8	101

[#] Actividad relativa = $\frac{\text{(UP/ml con detergente)}}{\text{(UP/ml sin detergente)}} \times 100$

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 filtro de aire y caseína, en lugar de negro de humo.
10	Disolución limpiadora	: 600 ml.
	Concentración de detergente	: 0,2%
	Temperatura de lavado	: 40°C
	Tiempo de lavado	: 30 minutos
15	Tiempo de enjuagado (aclarado)	: 10 minutos.

La actividad limpiadora es evaluada por medio de un contraste 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 lavado, aclarado y secado en las condiciones especificadas en el ensayo de lavado mecánico, las telas lavadas resultantes son puntuadas por cinco jueces, según los siguientes patrones de puntuación:

25	+2	: La limpieza de la tela lavada con un detergente que contiene enzima es claramente superior a la lavada con el correspondiente detergente desprovisto de enzima.
30	+1	: La limpieza de la tela lavada con un detergente que contiene enzima es ligeramente superior a



la lavada con el detergente correspondiente des-
provisto de enzima:

O : 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 detergen-
tes.

Tabla 4

Tipo de deter- gente	Puntuación de los jueces					Puntuac. 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

20

Ejemplo 6

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

25

Los cultivos son después centrifugados, dando lí-
quidos 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 resultante, por

30



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.

5

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>niveum</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 saubineti</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-C₁₂alcoholifenolétersulfato 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 partes en peso del polvo de enzima cruda preparado en el Ejemplo 2, y una pequeña cantidad de un aroma, dando un detergente líquido para uso en cocinas.

25

Ejemplo 8

Champú para el cabello: En 64 partes en peso de agua

380768²⁸



5 caliente a 60-65°C son disueltas 5 partes en peso de lanolina acetilada, 6 partes en peso de Alkylolamine (American Alcolac Corp.) y 25 partes en peso de Duponol XL (E.I. DuPont de Nemours Company). Después de dejarla enfriar, la disolución es suplementada con 0,2 partes en peso de polvo de enzima cruda preparado en el Ejemplo 2 y una pequeña cantidad de un aroma, para obtener un champú para el cabello.

10 Esta solicitud que corresponde a las presentadas en Japón el 8 de Febrero de 1968, bajo el número 7863/1968 y 15 de Marzo de 1968, bajo el número 16970/1968; reivindicaciones 1-5, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

REIVINDICACIONES

20 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:

25 1ª.- Un método para preparar un agente de limpieza que contiene una proteasa alcalina, que comprende: añadir a un detergente o limpiador de base que incluye, al menos, un agente tensioactivo, una proteasa alcalina producida por microorganismos productores de dicha proteasa alcalina, pertenecientes al género Fusarium o al género Gibberella,

30

22.9.72

JGA.



en una cantidad de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 5.000 UP por gramo del producto final, por el método de Kunitz modificado.

5 2^a.-- Un método según la reivindicación 1, en el cual dicho agente tensioactivo incluye un tensioactivo aniónico y un tensioactivo no iónico.

10 3^a.-- Un método según la reivindicación 2, en el que dicho tensioactivo aniónico incluye una sal de ácido graso, alcohol sulfato, olefinsulfato, alcohol sulfonato, olefin-sulfonato y alcoholaril sulfonato.

15 4^a.-- Un método según la reivindicación 2, en el que dicho tensioactivo no iónico incluye éter de polioxietileno y alcohol, éter de polioxietileno y alcohol fenol, éster de polioxietileno y alcohol, éster de alcohol polivalente y alcohol y éster de azúcar.

20 5^a.-- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha proteasa alcalina resultante se caracteriza por las siguientes propiedades: (1) una constante de sedimentación (s_{20w}) de aproximadamente $3,19 \times 10^{-13}$; (2) un peso molecular de aproximadamente $2,65 \times 10^4$ (por el método de Archibald); (3) un análisis elemental de aproximadamente 46,72% en peso de carbono, aproximadamente 6,59% en peso de hidrógeno y 15,3% en peso de nitrógeno; (4) una absorción máxima, en su espectro de absorción ultravioleta es a la longitud de onda de 275 a 280 m/ μ ; (5) un espectro de absorción infrarrojo en el que las bandas importantes de absorción, en micrones, son las siguientes:

25

30

22.9.72

JGA.

380768



5 3,0 (intensa); 3,38 (media); 6,05 (intensa); 6,55
(intensa); 6,88 (débil); 7,15 (media); 8,12 (media);
9,30 (débil); (6) un punto isoelectrico de aproxima-
damente pH 11; (7) una actividad óptima a un pH de des-
de 8 a 12 y a una temperatura de desde aproximadamen-
te 40°C a aproximadamente 50°C; (8) ser estable en el
intervalo de pH de entre 5 y 8, en 1 hora de incuba-
ción a 37°C; (9) tener una pérdida de actividad de 20
10 a 80% al ser calentada a 65 y 70°C, respectivamente,
en la incubación de 10 minutos a pH 5,0.

6º.- Un método para preparar un agente de
limpieza que contiene una proteasa alcalina.

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

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

Madrid, 28 SET. 1972

P.A.

Alberto de Elizaburu
Per Poder

22.9.72

JGA.