

387512

21



387512

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C12</u> <u>C11</u>
SUBCLASE <u>D</u> <u>D</u>

PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita a favor de SOCIETE RAPIDASE,  
 S.A., de nacionalidad francesa, con domicilio en SECLIN (Fran-  
 cia), y que ha de recaer sobre " PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARA-  
 CION DE PROTEASA ALCALINA MICROBIANA POR FERMENTACION CON BACI-  
 LIUS SUBTILIS VARIEDAD LICHENIFORMIS.

5

Memoria descriptiva

El registro de la patente de invención que se solicita tie-  
 ne por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el te-  
 rritorio nacional y sus posesiones de un procedimiento para la  
 preparación de proteasa alcalina microbiana por fermentacion con  
 bacillus subtilis variedad licheniformis, conforme se describe a  
 continuación .

10



387512 21 ENE

5 El término "proteasa alcalina" representa una clase de enzi-  
mas proteolíticas que son activas dentro del margen de pH alcalino,  
a saber entre aproximadamente pH 8 y 11,5. Estos materiales son  
grandemente prometedores como agentes de limpieza para eliminar su-  
ciedad de ropas en los casos frecuentes en que las manchas tienen  
componentes proteínicos. Una ventaja adicional de estos materiales  
consiste en que pueden ser utilizados generalmente en unión con de-  
tergentes comerciales. Así, se dispone de formulaciones detergentes  
que contienen proteasa alcalina para mejorar el rendimiento de las  
10 mismas.

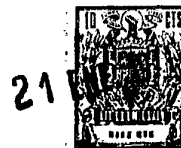
Es conocido actualmente en la técnica el producir proteasa  
alcalina por cultivo del organismo Bacillus subtilis. No obstante,  
muchos organismos de esta especie proporcionan un bajo rendimiento  
de proteasa alcalina, y por lo tanto la producción del material a  
partir de estos organismos es ineficaz y costosa.  
15

Se ha encontrado que la variedad licheniformis del organismo  
Bacillus subtilis proporciona rendimientos grandemente mejorados  
de proteasa alcalina si se la compara con otras variedades de Baci-  
llus subtilis y por tal razón proporciona ventajas sustanciales en  
la preparación de proteasa alcalina por razón de las ganancias sus-  
tanciales de eficacia de producción obtenidas por utilización del  
organismo. Algunas autoridades consideran que la especie licheni-  
formis es una especie separada de subtilis. Sin embargo, es muy si-  
milar a subtilis, y es considerada como una sub-especie o variedad  
20 de la misma para los fines de esta solicitud.

La proteasa producida a partir de licheniformis es separada  
del cultivo, preferiblemente por precipitación con metanol u otro  
disolvente polar no acuoso.

La proteasa alcalina producida mediante este invento tiene  
generalmente mayor actividad a elevadas temperaturas que otras pro-  
teasas alcalinas, facilitando su utilización en máquinas lavadoras  
30 automáticas.

387512



Descripción del invento.

5 Se cultivan organismos licheniformis en un medio nutriente con adiciones, a incrementos periódicos, de carbohidratos solubles durante una porción principal del periodo de cultivo, para mantener una concentración de azúcares reductores de aproximadamente 0,1 a 2% en peso, y preferiblemente de 0,4 a 1% en peso, del medio de cultivo. Preferiblemente, el cultivo se lleva a cabo bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 a 40°C y a un pH de 5,0 a 8,0 a lo largo del periodo de cultivo, con el fin de  
10 obtener un rendimiento ventajosamente elevado de proteasa alcalina

Una ventaja de la utilización de licheniformis es que éste proporciona un bajo rendimiento de subproducto de amilasa, mientras que otros organismos productores de proteasa de elevado rendimiento tienden a producir grandes cantidades de amilasa.

15 Se prefiere particularmente mantener un pH de 6,0 a 6,6 y una temperatura de 34 a 38°C a lo largo de la operación de cultivo

La frecuente adición de carbohidratos solubles durante la operación de cultivo, por pequeños incrementos, para mantener la concentración de azúcares reductores arriba citada, aumenta el  
20 crecimiento del organismo y la producción de proteasa alcalina en un grado inesperado.

Generalmente, se utiliza almidón degradado como manantial de carbohidratos. El almidón puede ser degradado para dar un peso molecular reducido de muchas maneras, por ejemplo por la utilización de enzimas, por calor, por ácidos, o por cualesquiera otros  
25 medios deseables.

El medio nutriente inicial en el que se introduce Bacillus subtilis, variedad licheniformis, tiene generalmente un contenido de carbohidratos de aproximadamente 10 a 20% en peso. Después de que la concentración de azúcares reductores del medio nutriente ha sido reducida a menos de aproximadamente 2% en peso por ac-  
30

387512

21



ción metabólica del microorganismo, se añade generalmente más cantidad de carbohidratos por incrementos frecuentes, tal como se describe anteriormente.

5 La concentración de azúcares reductores puede ser determinada colorimétricamente mediante un colorímetro de Klett, utilizando un filtro 54 (550 mμ). La reducción de ácido dinitrosalicílico en el medio a ensayar es medida y comparada con un patrón de glucosa en agua destilada. La concentración de azúcares reductores es calculada a continuación sobre una base de glucosa, es decir partiente  
10 del supuesto de que el único agente reductor presenta es glucosa, y calculando la concentración de glucosa supuesta como la concentración de azúcares reductores.

Después que se ha desarrollado el cultivo, generalmente durante un periodo de tiempo que produzca un rendimiento máximo de  
15 proteasa alcalina, la proteasa es separada de modo conocido del resto del medio. Esto se puede efectuar filtrando el medio para eliminar sólidos extraños, lavando los sólidos y precipitando luego proteasa alcalina a partir del filtrado.

Disolventes polares que tienen un bajo contenido de agua son  
20 generalmente útiles para precipitar la proteasa alcalina desde un filtrado de cultivo. Disolventes típicos que se pueden utilizar son acetona, éter dietílico y alcoholes de no más de aproximadamente 3 átomos de carbono, tales como metanol, etanol e isopropanol. Se pueden utilizar también mezclas de disolventes polares. Otra clase  
25 de materiales para precipitar proteasa alcalina desde un filtrado de cultivo son las sales solubles, por ejemplo sulfato de amonio, sulfato de sodio, nitrato de potasio y cloruro de sodio.

Antes de la precipitación de proteasa alcalina a partir del filtrado del cultivo, es deseable evaporar éste y la solución del  
30 lavado añadida hasta aproximadamente 30 a 40% de su peso inicial.

387512<sub>21 EN</sub>



Luego la proteasa alcalina es precipitada a partir del producto evaporado, preferiblemente con un alcohol que no tenga más de 3 átomos de carbono, tal como metanol.

5 La proteasa así producida tiene generalmente una actividad proteolítica máxima en un margen de temperaturas de aproximadamente 57 a 67°C, a aproximadamente pH 8,5.

Los siguientes ejemplos se dan solo con fines ilustrativos y no han de ser considerados como limitativos del invento objeto de esta memoria.

10

Ejemplo 1.

(A) Se hizo crecer un cultivo de Bacillus subtilis, variedad licheniformis, bajo condiciones aerobias, en un medio de cultivo con un pH de 6,0 a 6,7 a una temperatura de 35 hasta 37°C.

15

El medio de cultivo contenía los siguientes constituyentes:

Fécula de maiz degradada con amilasa	30% en peso
Levadura comprimida	0,1 hasta 0,8% en peso
Líquido de maceración de maiz	0,9 hasta 2,5% en peso
Lactosa	0,1 hasta 1,5% en peso
20 Acido fosfórico	0,5 hasta 1,8% en peso
Carbonato de calcio	1% en peso
Sulfato de magnesio	vestigios
Sulfato de manganeso	vestigios
Sulfato de zinc	vestigios
25 Sulfato de cobre	vestigios
Carbonato de hierro	vestigios
Agua	el resto

25

30

Quando el crecimiento del organismo hizo que la concentración de azúcares reductores disminuyese por debajo de 1%, se añadió más cantidad de almidón degradado con amilasa, por incremen-

387512 24 EMB



tos frecuentes, para mantener el nivel de azúcares reductores entre aproximadamente 0,1 y 2% en peso.

5 Después de fermentación durante 50 hasta 60 horas, se encontraron en la papilla de cultivo aproximadamente 29.000 unidades de actividad de proteasa por ml. La proteasa fué precipitada con metanol y filtrada.

10 (B) La repetición del experimento anterior sin la adición de almidón degradado por incrementos frecuentes dió como resultado un rendimiento máximo de aproximadamente 20.000 unidades de actividad de proteasa por ml después de aproximadamente 40 horas de fermentación.

Las unidades de actividad de proteasa fueron calculadas del siguiente modo:

15 Una solución tampón de 3,0 g de tris-(hidroximetil)-aminometano (conocido como "tris"), mezclada con 400 ml de agua destilada fué preparada y valorada con ácido clorhídrico 1 N a pH 8,5, mientras se agitaba se añadió luego agua destilada para constituir un volumen de 500 ml.

20 Se preparó una solución de substrato añadiendo 1,3 g de caseína a 80 ml de un tampón "tris" 0,05 M a pH 7,6 y se agitó con calentamiento para disolver la caseína. Después de enfriamiento, se añadió solución tampón adicional para constituir un volumen de 100 ml.

25 En una serie de tubos de ensayo se preparó una mezcla, a la que se añadieron los productos que contienen enzimas preparados en la fermentación arriba descrita; fué preparada en una serie de tubos de ensayo, mezclando en cada tubo 3 ml de la solución de substrato anterior, 3 ml de solución de hidróxido de sodio 0,02 N, y 3 ml de solución de tripolifosfato de sodio 0,014 M, llevada a pH 30 8,5 con HCl. Los tubos se cerraron con tapones y fueron llevados a

387512<sub>21</sub> ENE.



una temperatura de 37°C. Se cuidó que el pH fuera 8,5 ó superior.

Con la otra mano se consultó un reloj, y en un momento dado se añadieron a cada tubo de ensayo 3 ml de una solución de enzimas conteniendo la proteasa alcalina que había de ser analizada, excepto un "substrato patrón" testigo que en lugar de ello recibió 3 ml de la solución tampón arriba preparada. Los tubos fueron mezclados o removidos durante al menos 30 segundos golpeando ligeramente las paredes de los tubos e incubando luego a 37°C. Exactamente 15 minutos después de haber añadido la solución de enzimas, se añadieron a cada tubo 10 g de solución de ácido tricloroacético, preparada añadiendo 18 g de ácido tricloroacético, 19 g de acetato de sodio y 18,9 ml de ácido acético glacial a un recipiente, y después se diluyó hasta 1 litro con agua destilada. Esta mezcla destruye la enzima y evita una hidrolización adicional por la enzima de la caseína presente. Los contenidos de cada tubo fueron filtrados a continuación a través de papel Whatman Nº 42 de 11 cm. siendo refiltrada a través del papel la primera porción del producto filtrado.

Simultáneamente, se preparó una "enzima patrón" incubando 5 ml de la solución de enzima durante 15 minutos a 37°C. La solución fué añadida a continuación a una mezcla de 3 ml de solución de substrato, 3 ml de hidróxido de sodio 0,2 N y 3 ml de tripolifosfato de sodio 0,044 M, después que la mezcla había sido incubada durante 15 minutos a 37°C, y se añadieron 10 ml de la solución de ácido tricloroacético antes citada. Después de añadir la solución de enzimas la mezcla fué incubada nuevamente a 37°C con agitación ocasional durante media hora y filtrada.

Las densidades ópticas de cada uno de los anteriores productos filtrados se determinaron a continuación a 275 mμ, utilizando una celda de 10mm y un espectrofotómetro ajustado con un punto de transmisión de cien por cien, que es la lectura del "substrato pa-

387512 21



trón" arriba preparado. Las lecturas fueron corregidas a continuación restando la densidad óptica de la "enzima patrón" arriba preparada de las densidades ópticas de las otras soluciones de ensayo.

5 La cantidad de proteasa alcalina presente es expresada luego en unidades de actividad que son calculadas por la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l}
 \text{Unidades de proteasa actividad} = \frac{\text{La densidad óptica corregida a 275 m\mu de la mezcla hidrolizada en el tubo de ensayo}}{\text{La densidad óptica a 275 m\mu de 1,5 mg de tirosina x ml (a saber 0,0114)}} \times \frac{\text{volumen (a saber, 22ml)}}{\text{tiempo (a saber, 15 minutos)}}
 \end{array}$$

10

15 Dicho brevemente, una unidad de actividad es la cantidad de enzima que en un minuto, bajo las condiciones del ensayo anterior, produce suficiente cantidad de tirosina y de otros materiales por hidrólisis de caseína para proporcionar una densidad óptica a 275 mμ que es la misma de la de una solución de tirosina que contiene 1,5 mg de tirosina por ml.

20 Ejemplo 2.- Se obtienen resultados generalmente equivalentes cuando se repiten los experimentos de los ejemplos 1(A) y 1(B) utilizando un medio de cultivo que contiene sólo 3,5% en peso de la fécula de maiz degradada con amilasa, siendo reemplazado el resto de la fécula de maiz por agua, y llevándose a cabo la fermentación a una temperatura de 37 a 42°C durante 70 a 80 horas.

25 Ejemplo 3:  
(A) Un cultivo de Bacillus subtilis, variedad licheniformis fué calentado a 60°C durante 20 minutos en una solución de cloruro de sodio al 0,85%, inoculada sobre un taco de patata, dejándola crecer durante 24 horas a 37°C. Después de esto, porciones del taco de patata fueron añadidas a 1000 ml de una mezcla que contenía 4 g de dextrosa, 5 g de cloruro de sodio, 10 g de triptona, 3 g de extrac-

30

387512<sup>1</sup> E



to de levadura, y el resto agua. Esta mezcla fué incubada durante 18 horas a 37°C sobre un agitador rotatorio para formar un inóculo bacteriano.

Se preparó una composición de papilla que contenía los siguientes ingredientes:

5

	<u>Ingrediente</u>	<u>Partes en peso de ingrediente</u>
	Solución de almidón degradado con amilasa (45% en peso de almidón)	124,0
	Lactosa	4,3
10	K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	4,3
	Líquido de maceración de maiz	26,0
	Acido fosfórico (al 75%)	12,9
	Levadura de cerveza	7,2
	Proteína de soja (Kaysoy)	3,65
15	Carbonato de Calcio	2,88
	Sulfato de magnesio hidratado	1,25
	Cloruro de sodio	0,72
	Una mezcla de 5 partes en peso de salvado y 4 partes en peso de aceite de tocino	9,0
20	Sulfato ferroso hidratado	vestigios
	Sulfato de manganeso hidratado	vestigios
	Sulfato de zinc hidratado	vestigios
	Agua	suficiente para constituir un peso total de 1000 partes en peso.

25

La papilla anterior fué esterilizada de modo discontinuo durante 45 minutos a una temperatura de 125 hasta 130°C, y enfriada a 35 hasta 37°C. Se añadió amoníaco estéril para proporcionar un pH de 6,3 hasta 6,6. Aproximadamente 0,3% en peso del inóculo bacteriano anteriormente preparado se añadió a la papilla, y se dejó proseguir la fermentación durante aproximadamente 20 horas con aireación y

30

3875 12<sup>21</sup>



agitación. Durante este periodo la temperatura se mantuvo a 35 hasta 37°C, y el pH entre 6,1 y 6,5 por adición periódica de amoníaco.

5 Después de esto, se preparó otra composición de papilla similar a la papilla anterior, excepto que se añadieron 372 partes en peso de la solución de almidón degradado con amilasa al 45%, añadiéndose correspondientemente menos cantidad de agua. La papilla fué esterilizada de modo discontinuo bajo las condiciones antes descritas, fué enfriada a 35 hasta 37°C, y se añadió amoníaco  
10 para proporcionar un pH de 6,4 hasta 6,6.

Aproximadamente 80 partes en peso de la papilla fermentada anteriormente se añadieron a la nueva composición de papilla, y se dejó proseguir la fermentación durante 58 horas, bajo las condiciones de fermentación anteriores. El contenido de carbohidratos  
15 de la mezcla de fermentación se analizó periódicamente, y se realizaron adiciones periódicas de aproximadamente 17 partes en peso de la anterior solución de almidón degradado con amilasa, para mantener la concentración de azúcares reductores entre 0,4 y 1% en peso. Típicamente, se efectuaron adiciones de carbohidratos a intervalos de tres horas.  
20

La proteasa alcalina presente fué analizada por el método arriba descrito para proporcionar los siguientes resultados:

	<u>Horas de fermentación</u>	<u>Unidades de actividad de proteasa por ml</u>
	34	2.784
25	42	23.865
	46	24.166
	50	24.682
	58	23.693

30 La papilla resultante fué filtrada a continuación y el residuo de filtración fué lavado con agua corriente.

El producto filtrado fué evaporado hasta una concentración de aproximadamente 18° Bé y luego fué enfriado a 3°C y ajustado a

387512

21 EN



un pH ligeramente ácido. Se añadió metanol para proporcionar una concentración de metanol de aproximadamente 80% para precipitar la proteasa, la cual fué separada luego por filtración desde la fase líquida.

5 La proteasa alcalina producida por el anterior procedimiento exhibe una actividad proteolítica máxima a aproximadamente 60 hasta 65°C, medido por su hidólisis de caseína durante 10 minutos a pH 8,5. La proteasa alcalina exhibe actividad proteolítica máxima a aproximadamente pH 10 a una temperatura de 37°C y a aproximadamente pH 9,6 a 61°C.

10

(B) Se repitió el experimento anterior excepto que no se añadieron incrementos de solución de almidón degradado con enzimas durante el periodo de tiempo de fermentación. Se obtuvieron los siguientes resultados:

15

<u>Horas de fermentación</u>	<u>Unidades de actividad de proteasa por ml.</u>
30	13.118
34	15.930
42	10.395

20

Las unidades de actividad de proteasa de este ejemplo son las que se definen en el Ejemplo 1.

Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser siempre tomados en sentido amplio, no limitativo.

#### NOTA DE REIVINDICACIONES

25

Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de SOCIÉTÉ RAPIDASE, S.A., con domicilio en SECLIN (Francia), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

30

PRIMERA.- Procedimiento para la preparación de proteasa alcalina microbiana por fermentación con *Bacillus subtilis* variedad liche-

387512<sup>24</sup>



niformis, caracterizado en que se cultiva un microorganismo de la especie Bacillus subtilis, variedad licheniformis, aeróbicamente, en un medio nutriente a un pH de 5,0 hasta 8,0 añadiendo durante una porción principal del periodo de cultivo del microorganismo de modo frecuente y por incrementos, carbohidrato soluble en agua, para mantener una concentración de azúcares reductores en dicho medio entre aproximadamente 0,1 y 2% en peso.

5

SEGUNDA.- Un procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que dicho carbohidrato es un almidón degradado.

10

TERCERA.- Un procedimiento según la reivindicación segunda, caracterizado en que la temperatura es 30 a 40°C.

CUARTA.- Un procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que dicha temperatura es 34 a 38°C y dicho pH es 6,0 a 6,6.

15

QUINTA.- Un procedimiento según la reivindicación cuarta, caracterizado en que dicha concentración de azúcares reductores es mantenida entre 0,4 y 1% en peso.

SEXTA.- Un procedimiento según la reivindicación cuarta, caracterizado en que dicho microorganismo es cultivado colocándolo en un medio nutriente que tiene de aproximadamente 10 a 20% en peso de carbohidrato en la forma de almidón degradado, basado en el peso del medio nutriente, y en el que, después de que dicho carbohidrato se haya reducido a menos de aproximadamente 2% en peso por acción metabólica de microorganismos, se añade carbohidrato, por incrementos frecuentes, para mantener la concentración de azúcares reductores en dicho medio entre aproximadamente 0,4 y 1% en peso.

20

25

SEPTIMA.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PROTEASA ALCALINA MICROBIANA POR FERMENTACION CON BACILLUS SUBTILIS VARIEDAD LICHENIFORMIS.

30

387512



Tal y como se deja descrito en la memoria precedente que consta de trece hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 21 de Enero de 1.971

P.A. de SOCIETE RAPIDASE, S.A.

Victor Gil Vega.

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style. The signature is positioned below the typed name "Victor Gil Vega." and appears to be a stylized representation of the name.

A small, handwritten mark or signature located in the bottom left corner of the page. It consists of a few simple, connected strokes, possibly representing the initials "G.V." or a similar mark.