

403261



P.- 51.032  
45178/AS

MEMORIA DESCRIPTIVA para solicitar

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

PATENTE DE INVENCION en ESPAÑA

por VEINTE años

A nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S

entidad danesa

Int. Cl.: C 12 D
------------------

establecida en 215, Nordre Fasanvej, DK-2200 Copenhagen,  
Dinamarca.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA ENZIMA PRO-  
TEOLITICA ALCALINA"

(Clase Internacional C07g)



La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto de enzima, a los productos de enzimas preparados por medio de dicho procedimiento, y al uso de estos productos en agentes de limpieza y depiladores. El término "agentes de limpieza" engloba detergentes así como agentes de lavado de vajilla.

Según ello, la invención se refiere específicamente a una nueva enzima proteolítica alcalina que tiene propiedades superiores como aditivo para agentes de limpieza y como agentes y depiladores, a un procedimiento para la preparación de dicha enzima proteolítica alcalina así como en forma de aditivo para detergentes, agentes de lavado, agentes de limpieza y agentes de lavado de vajillas, y, además, un agente depilador, que comprende una enzima proteolítica alcalina.

Las enzimas proteolíticas producidas por cultivo de miembros del género Bacillus en medios nutrientes adecuados son ampliamente usadas en detergentes. Es importante, para el adecuado funcionamiento de estas enzimas, que sean activas en disoluciones de detergente, es decir a valores de pH en el intervalo de 9 a 11, y en presencia de agentes secuestrantes, tensioactivos, y en algunos casos de perborato de sodio.

Es importante también para la economía del procedimiento, que la enzima pueda usarse de modo efectivo en una concentración tan baja como sea posible.

Según la presente invención, se ha descubier-

403261



to ahora que el Bacillus firmus, cepa NRS 783, cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, forma una composición de enzima proteolítica que es particularmente adecuada para uso en detergentes, en los que determina un valor o índice de limpieza sorprendetemen-  
5 te elevado a una concentración muy baja.

La cepa NRS 783 del Bacillus firmus puede obtenerse del Departamento de Agricultura de los EE.UU. Agricultural Research Service, Northern Utilisation Research and Development Division, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604,  
10 EE.UU., como cepa NRRL N° B 1107.

Para producir la enzima proteolítica, el Bacillus firmus NRS 783 es cultivado en condiciones aerobias en un medio nutriente que contiene carbono y nitrógeno asimilables, juntamente con otros nutrientes esenciales, siendo la composi-  
15 ción del medio según los principios de la técnica conocida.

Son fuentes de carbono adecuadas los hidratos de carbono, tales como sacarosa, glucosa y almidón, o los materiales que contienen hidratos de carbono, tales como granos de cereales, malta, arroz y sorgo. La concentración de hidratos de carbono incorporados en el medio puede variar ampliamente, por  
20 ej. hasta el 25 por ciento y hacia abajo hasta 1-5 por ciento, pero usualmente es adecuado un 8-10 por ciento, calculándose los tantos por ciento como dextrosa.

La fuente de nitrógeno en el medio nutriente  
25 puede ser de naturaleza inorgánica y/u orgánica. Son fuentes ade-

403261

23



cuadas de nitrógeno inorgánico los nitratos y las sales de amonio. Entre las fuentes de nitrógeno orgánicas hay algunas usadas regularmente en los procedimientos de fermentación que implican el cultivo de bacterias. Son ejemplos ilustrativos harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de cacahuete, caseína, el líquido de maceración de maíz, extracto de levadura, urea y albúmina. Además, el medio nutriente ha de contener además las sustancias que usualmente están presentes como trazas.

La temperatura a la que se efectúa el cultivo usualmente está comprendida en el intervalo empleado normalmente para el cultivo de especies del género Bacillus. La temperatura es preferiblemente de 30 a 40°C. Como el cultivo ha de efectuarse bajo condiciones aerobias, es necesario emplear una aireación artificial cuando las bacterias se desarrollan en depósitos de fermentación. La cantidad de aire usada es similar a la empleada en los procedimientos de cultivo convencionales.

Generalmente se prefiere efectuar el cultivo a valores alcalinos de pH. Estos pueden obtenerse por adición de tampones adecuados, tales como el carbonato de sodio o una mezcla de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio, después de la esterilización del medio.

Después de la fermentación, las preparaciones de enzima líquidas pueden producirse por extracción del material grueso del caldo, o si se desea por concentración del caldo por evaporación a baja temperatura por ósmosis inversa.

403261

23



Finalmente pueden añadirse agentes protectores al caldo.

Las preparaciones de enzima sólidas pueden prepararse a partir del caldo purificado y/o concentrado por precipitación con sales, tales como  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  o con disolventes miscibles con el agua, tales como el etanol o acetona; puede emplearse también la extracción del agua del caldo por métodos adecuados de secado, tales como secado por pulverización.

La invención se ilustra además en los Ejemplos siguientes.

10

Ejemplo 1

Se cultivó Bacillus firmus NRS 783 a 30°C sobre una mesa sacudidora giratoria (220 rpm) en matraces Erlenmeyer de 500 ml protegidos, que contenían 100 ml. de medio de la composición que se da más adelante. Al cabo de 6 días de incubación se determinó la actividad proteolítica del cultivo usando el método de Anson de la hemoglobina, ajustándose el pH del sustrato al valor apropiado con NaOH. (J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939). Si no se indica otra cosa, en los que sigue la actividad proteolítica se mide según este método.

20

Composición del medio en gramos por litro:

Almidón de patata	40
Cebada molida	100
Harina de soja	30
$\text{CO}_3\text{Ca}$	5
Aceite de soja	0,5

25

17.6.72  
FC

403261

23



El almidón del medio es licuado con alfa-amilasa y el medio es esterilizado por calentamiento a 120°C durante 45 minutos.

Después de la esterilización, el pH del medio se ajusta a 9,7 por adición de 10 por ciento de una disolución 1M de sesquicarbonato de sodio.

Después del cultivo, la actividad de la enzima del caldo a pH 7,5 era de 50 UA/l. (unidades Anson por litro).

Ejemplo 2

10 Se hizo una preparación de enzima pura como sigue:

Un caldo de cultivo fermentado, preparado de la manera descrita en el Ejemplo 1, fué centrifugado. Precipitando el líquido que sobrenadaba con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , se obtuvo un producto de enzima con una actividad enzimática de 2,34 UA/g. Este precipitado crudo fué disuelto de nuevo, precipitado con acetona y dializado. La preparación de enzima fué cromatografiada sobre una columna de cambio de iones CM-52, efectuándose la elución con un tampón que contenía TRIS-maleato  $10^{-3}$  molar y acetato de calcio  $2 \times 10^{-3}$  molar, con un pH de 6,5. Se hace referencia a la figura del dibujo, de la que se deduce que la elución con un gradiente lineal de  $\text{ClNa}$  produjo el máximo de actividad, que fué recogido en las fracciones Nos. 115 a 140. El líquido reunido de estas fracciones fué dializado y secado por congelación, con lo que se formó una preparación exenta de sales y con un bajo contenido de péptidos y una actividad de 71,5

17.6.72  
FC

403261



UA/g.

Se determinaron las siguientes características de la preparación según el Ejemplo 2.

La relación entre la actividad y el pH se determinó de las siguientes maneras:

a) El sustrato era hemoglobina desnaturada con urea.

Se usó el método de Anson antes citado como método de análisis. Se investigó el intervalo de pH entre 7 y 12, ajustándose el pH del sustrato con NaOH 1N ó ClH 1N al valor adecuado. Se encontró que el óptimo de pH-actividad era de aproximadamente 9, como puede deducirse de la tabla siguiente, en la que por razones de comparación se incluyen también los valores correspondientes del Subtilisin Carlsberg y de una enzima según la Patente Británica N° 1.243.784:

17.6.72  
FC

403261



pH	7	8	9	10	11	12
% de actividad del máximo, Subtilisin Carlsberg	93	98	100	96	84	66
5 % de actividad del máximo, enzima según la Patente Británica 1.243.784	65	94	99	99	97	93
% de actividad del máximo, enzima según la invención	65	97	100	94	85	76

b) El sustrato era caseína, y el método de análisis fue una modificación del método descrito por Tsuru y otros, Agr. Biol. Chem. 30, 652 (1966). La caseína, que se usa en este ensayo y en los siguientes, es caseína Hammarsten. El método era como sigue:

15 Sustrato: 10 ml. de una disolución al 1 por ciento de caseína, en tampón universal Britton y Robinson (J. Chem. Soc. 1931, pág. 1456) ajustado al valor adecuado de pH.  
2 ml. de agua destilada.

La mezcla es precalentada a 40°C en un baño de agua durante 10 minutos; después se añaden 2 ml. de disolución de enzima, y al cabo de 30 minutos de reacción a 40°C la proteína no degradada es precipitada por adición de 5 ml. de ácido tricloroacético al 10 por ciento. Al cabo de 10 minutos de reposo a 40°C para completar la precipitación, el precipitado es extraído por filtración a través de un filtro Whatman del N° 42, y se toma la  
25 densidad óptica a 276 nanómetros (nm) frente a una muestra en blan-

403261



co que es preparada de la misma manera excepto en que se añade ácido tricloroacético al sustrato antes que la enzima.

La densidad óptica se usa directamente como expresión de la actividad proteolítica.

5 Con fines de comparación, se determinan simultáneamente los valores de pH y actividad del Subtilisin Carlsberg y una enzima preparada según la Patente Británica Nº 1.243.784. Los valores de pH y actividad aparecen en la Tabla siguiente, y de ella se deduce que la enzima según la  
10 invención tiene un pH de actividad óptima de 11,0 y que el Subtilisin Carlsberg tiene un pH de actividad óptima de 10,5.

pH	7	8	9	10	10,5	11	12
% de actividad del máximo, Subtilisin Carlsberg	47	59	70	94	100	93	5
15 % de actividad del máximo, enzima según la Patente Británica Nº 1.243.784	39	51	57	61	62	76	100
% de actividad del máximo, enzima según la invención	24	41	55	74	89	100	62

20 La relación entre la actividad y la temperatura fué determinada de las maneras siguientes:

a) El sustrato era hemoglobina desnaturalizada con urea.

Se usó el método de Anson antes citado  
25 como método de análisis. El intervalo de temperatura investiga-

403261

do era de 25 a 80°C, y el pH era de 7,5. Se encontró que el óptimo de temperatura era de 50°C, como puede verse en la tabla siguiente:

	Temperatura	25	40	50	60	70	80
5	% del máximo	27	67	100	41	18	9

b) El sustrato de hemoglobina fué preparado según el artículo antes citado en el Journal of General Physiology, pero excluyendo la urea. Cuando se añade el tampón de fosfato, parte de la hemoglobina es precipitada. Este precipitado es extraído por filtración, y el líquido de filtración resultante se usa como sustrato. El método usado como método de análisis fué el de Anson. El intervalo de temperatura investigado fué de 25 a 80°C y el pH fué de 7,5. Se encontró que el óptimo de temperatura era de 60°C, como puede verse en la tabla siguiente, en la que para comparación se incluyen los valores correspondientes de una enzima preparada según la Patente Británica N° 1.243.784.

	Temperatura	25	40	50	60	70	80
	% del máximo, enzima según						
20	la Patente Británica N°						
	1.243.784	10	26	40	70	100	30
	% del máximo, enzima según						
	la invención	16	43	61	100	30	13

La relación entre la estabilidad y el pH fué determinada de la manera siguiente:

23 JUN 1962

403261

La preparación de enzima según el Ejemplo 2 fué disuelta en agua desionizada con adición de tampón de Britton y Robinson (J. Chem. Soc., 1931, pág. 1456) a una concentración de 0,5 mg/100 cm<sup>3</sup>. La disolución se mantuvo durante 10 minutos a 5 60°C a valores de pH de entre 4 y 12, y luego se analizó según el método de Anson. Se encontró que el óptimo de pH-estabilidad era de aproximadamente 6, como puede verse en la siguiente tabla.

	pH	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10	% del máximo	6	98	100	96	89	61	7	0	0

La estabilidad frente a la temperatura fué determinada de la manera siguiente:

La preparación de enzima según el Ejemplo 2 fué disuelta en tampón de borato 0,118 molar a una concentración de 15 0,25 mg/100 cm<sup>3</sup>, y se mantuvo durante 10 minutos a pH 10 a diferentes temperaturas. El intervalo de temperatura investigado fué de 30 a 70°C, y el método de análisis fué el método de Anson. Se comprobó que la enzima sera estable hasta 50°C, entendiéndose que estable significa una actividad residual de más de 20 80 por ciento. A 70°C la actividad residual era 0. La adición de Cl<sub>2</sub>Ca 0,005 molar estabilizó la enzima hasta un grado en que la actividad residual de la enzima a 70°C era de más del 60 por ciento.

La estabilidad en presencia de urea se determinó 25 del siguiente modo:

403261



La preparación de enzima según el Ejemplo 2 fué disuelta en urea 6 molar a pH 7,5 a una concentración de 0,125 mg/100 cm<sup>3</sup>, y se dejó reposar durante 30 minutos. Se efectuaron experimentos a 25, 40 y 50°C. El método de Anson fué el método de análisis.

5 Las actividades residuales a las diferentes temperaturas aparecen en la tabla siguiente:

	<u>Temperatura, °C</u>	<u>Actividad residual, %</u>
	25	96
	40	68
10	50	5

La inhibición de la enzima en presencia de diversos compuestos químicos fué investigada de la manera siguiente:

15 A una disolución de 2 mg. de la preparación de enzima según el Ejemplo 2 en 1 litro de tampón de TRIS maleato 10<sup>-3</sup> molar a pH 6,5 se le añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una cantidad correspondiente a una concentración de 0,01 molar. La actividad proteolítica se determinó según el método de Anson, y se encontró que el EDTA no inhibía a la enzima en absoluto.

20 A una disolución de 2 mg. de la preparación de enzima según el Ejemplo 2 en 1 litro de tampón de fosfato 1/15 molar a pH 7,5 se le añadió un exceso de diez veces, en una base molar, de fluoruro de fenil metil sulfonilo (FMSF). La actividad proteolítica se determinó según el método de Anson,  
25 y se encontró que el FMSF mostraba un efecto inhibitor total

17.6.72  
FC

403261

23



sobre la enzima. Esto muestra que la enzima según la invención es una proteinasa de tipo serina, que tiene serina en su centro activo.

Una disolución de 0,32 mg. de la preparación de enzima según el Ejemplo 2 en 100 ml. de una disolución al 0,2 por ciento de tripolifosfato de sodio, cuyo pH fué ajustado a 10, se mantuvo a 50°C durante 30 minutos, y se encontró que la actividad residual era del 3 por ciento. Es altamente sorprendente que la eficiencia de lavado, como se muestra más adelante, sea excelente a pesar del hecho de que la enzima, como se ha mostrado anteriormente, es inactivada después de su exposición al tripolifosfato de sodio, que es un ingrediente común de los detergentes. No se ha intentado hacer una explicación de esta contradicción aparente.

La actividad de esterasa fué determinada de la manera siguiente:

Los análisis fueron realizados según el método del pH constante, a pH 8,0 y a 30°C.

Se usaron las sustancias siguientes:

Ester etílico de N-acetil-L-tirosina (ATEE)  
Ester etílico de N-benzoil-L-arginina (BAEE)  
Ester metílico de N-tosil-L-arginina (TAME)  
Ester etílico de N-benzoil-l-leucina (BLEE)  
La concentración de los sustratos era como

sigue:

17.6.72  
FC

403261



ATEE: 0,02 molar en ClK 0,092 molar en agua (que contenfa 8 por ciento dioxano).

BAEE: 0,015 molar en ClK 0,43 molar en agua

5 TAME: 0,02 molar en ClK 0,092 molar en agua (que contenfa 8 por ciento de dioxano)

BLEE: 0,0075 molar en ClK 0,066 molar en etanol al 30 por ciento

Las actividades de la enzima, expresadas en forma de unidades de esterasa/mg. de preparaci3n de enzima seg3n el  
10 Ejemplo 2, correspondiendo 1 unidad de esterasa a 1 u mol de hidrolizado de sulstrato por minuto, son las siguientes:

ATEE: 62 unidades de esterasa/mg.

BAEE: 0,741 unidades de esterasa/mg.

TAME: 0,730 unidades de esterasa/mg.

15 BLEE: 13,7 unidades de esterasa/mg.

Para demostrar el car3cter 3nico de la enzima, en la tabla siguiente se muestra una comparaci3n con algunas enzimas conocidas:

		<u>Unidades de esterasa/UA</u>		
20	Enzima:	Subtilisin Carlsberg	Enzima seg3n Patente Brit3nica 1.243.784	Enzima seg3n la invenci3n
	<u>Sustrato</u>	<u>-----</u>	<u>-----</u>	<u>-----</u>
	ATEE	15.700	785	1.105
	BAEE	523	143	10
25	TAME	494	156	10
	BLEE	231	47	244

17.6.72  
FC

23 JUN 1972



403261

La constante de Michaelis se determina de las maneras siguientes:

Como sustrato se usa ATEE. La determinación se efectúa por el método de pH constante a pH 8,0 y a 30°C.

5 Las velocidades iniciales  $v$  se calculan sobre la base de la pendiente de la parte recta de la curva, que es dibujada por medio del gráfico de valoración.

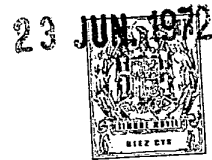
Se determina  $v$  a las siguientes concentraciones  $S$  de sustrato:  $S = 0,022, 0,015, 0,0074$  y  $0,0037$  molar de ATEE. A  
10 partir de una representación gráfica de Lineweaver-Burk se encuentra la constante de Michaelis:

$$K_m = 3 \times 10^{-2} \text{ M}$$

La constante de Michaelis se determina también con hemoglobina como sustrato. La determinación se efectúa según el  
15 método de Anson, a pH 7,5 y a 25°C. Las velocidades iniciales  $v$  se determinan de la manera siguiente: para cada concentración de sustrato se determina  $OD_{750}$  en función del tiempo de reacción.  $v$  es la pendiente de la tangente a la curva  $OD_{750}$  frente al tiempo de reacción en el punto de origen.  $v$  se determina a las si-  
20 guientes concentraciones  $S$  de sustrato:  $S = 0,35, 0,26, 0,21, 0,175, 0,150$  y  $0,130$  por ciento de hemoglobina. La constante de Michaelis se deduce de un gráfico de Lineweaver-Burke:

17.6.72  
FC

403261



Km = 0,2 por ciento de hemoglobina.

La proporción entre moléculas de péptidos grandes y pequeños en los productos de descomposición de la caseína se determina del modo siguiente:

5 Una disolución de caseína al 3 por ciento es digerida completamente a pH 8 (el tampón es borato 0,05 molar/ ClNa 0,2 molar) y a 50°C durante 3 horas por medio de las enzimas enumeradas más adelante. La mezcla de reacción es filtrada con gel sobre Sephadex G-25 superfino. Se recogen las fracciones y se determina la cantidad de péptidos de cada fracción espectrofotométricamente con ninhidrina.

La distribución entre péptidos grandes y pequeños se indica a continuación, definiéndose los péptidos grandes como péptidos con un peso molecular mayor de 1000, y definiéndose a los péptidos pequeños como péptidos con un peso molecular menor de 1000.

	Péptidos grandes, como tanto por ciento aproximado de los péptidos totales	Péptidos pequeños, como tanto por ciento aproximado de los péptidos totales
<u>Enzima</u>		<u>les</u>
Enzima según la invención	83	17
Enzima según la Patente Británica N° 1.243.784	46	54

403261



(continuación)

	Péptidos grandes, como tanto por ciento, apro- ximado de los péptidos	Péptidos pequeños, como tanto por ciento aproximado de los pép- tidos	
5	<u>Enzima</u>	<u>totales</u>	<u>totales</u>
	Subtilisin Carls		
	berg	54	46
	Tripsina	72	28

10 El peso molecular se determina de las siguientes maneras:

Por ultracentrifugación se determina la constante de sedimentación, que es de aproximadamente 3,0 Svedberg. El volumen específico es de  $0,72 \text{ cm}^3/\text{g}$ ., y el coeficiente de difusión es de aproximadamente  $10 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}^2$ . Se calculó que el peso molecular aproximado es de 26.000.

15 El peso molecular se determina también por filtración con gel sobre una columna con dimensiones de 2,5 cm x 45 cm. rellena con Sephadex G 75 superfino. La columna fué calibrada con Blue Dextran 2000 (peso molecular  $2 \times 10^6$ ), Cytochrome c (peso molecular 13.000) y  $\text{CrO}_4\text{K}_2$  (peso molecular 194). El tampón era TRIS 0,1 molar/ ClNa 1,0 molar, pH 8,0. El caudal era de 20 11 ml/hora. Se determinó que el peso molecular aproximado era 26.000.

25 El valor aproximado del punto isoelectrico, determinado por electroforesis de "contorno móvil" según A. Tise-



lius, era de  $pI = 11,0$ .

El tampón usado en la determinación se describe en G.L. Miller y R.H. Golder, Arch. Biochem. 29, págs. 420-423 (1950).

5 Se determinaron otros datos en relación con la preparación de enzima según el Ejemplo 2, siendo como sigue:

Coefficiente de extinción  $E_{279}^{1\%}$ , 1 cm = 11,5

10 Por medio de una valoración de centros activos con N-trans-cinamoil-imidazol, según Bender y otros (J. Am. Soc. 88, pág. 5890 (1966)) y con la suposición de un peso molecular de 26.000, se determinó que la pureza del producto era del 63 por ciento, lo que corresponde a una actividad específica

15 máxima obtenible de 114 UA/g.  $\pm$  10 UA/g.

Se hicieron algunas determinaciones adicionales en relación con la preparación obtenida según el Ejemplo 2, y los resultados de estas determinaciones se muestran en lo que sigue.

20 El análisis elemental efectuado en la preparación de enzima según el Ejemplo 2 dió los resultados siguientes:

C: 46,3% ; H : 7,2% ; N : 15,6% ;

S : 0,4%.

25 Se determinó la composición de aminoáci

# 403261



dos. Esta composición de aminoácidos se deduce de la tabla siguiente, en la que para comparación se indica la composición de aminoácidos de algunas enzimas conocidas en la técnica. Ha de entenderse que la exactitud de la determinación en relación con la enzima según la invención es la normal  $\pm 10\%$ .

Composición de aminoácidos

	Subtilisin Carlsberg <sup>+</sup>	B. amylosac chariticus <sup>++</sup>	Enzima se gún la Pat. Británica	Enzima se gún la in vención	
			1.243.784		
10					
	Lisina	9	6	2	4
	Histidina	5	5	4	6
	Amoníaco	25	-	23	-
	Arginina	4	3	8	6
15	Acido aspártico	28	20	25	23
	Treonina	19	14	13	14 <sup>+++</sup>
	Serina	32	37	22	22 <sup>+++</sup>
	Acido glutámico	12	12	11	14
	Prolina	9	10	6	12
20	Glicina	36	25	24	30
	Alanina	42	27	23	32
	Cistina 1/2	0	0	0	0
	Valina	31	20	12	21
	Metionina	5	3	2	2
25	Isoleucina	10	12	11	7



(continuación)

	Subtilisin Carlsberg <sup>†</sup>	B. amylosac- chariticus <sup>††</sup>	Enzima según la Pat. Bri- tánica	Enzima se- gún la in- vención
5			<u>1.243.784</u>	
Leucina	16	12	11	16
Tirosina	13	9	9	6 <sup>†††</sup>
Fenilalanina	4	2	3	2
Triptófano	1	3	2	-
10	Peso molecular 27.300	22.700	20.000	26.000

(<sup>†</sup>) R.J. Delange, E.L. Smith, J. Biol. Chem. 243, 2134

(1968)

(<sup>††</sup>) Patente de los EE.UU. Nº 3.622.458

(<sup>†††</sup>) no corregida por pérdidas debidas a hidrólisis

15 Se obtuvieron datos de electroforesis ácida en disco,  
de la manera siguiente:

La electroforesis se efectuó con un sistema 8 Reis-  
feld con 7,5 por ciento de gel y a pH 4,3. El gel fué fijado du-  
rante 30 minutos con 12,5 por ciento de ácido tricloroacético, y  
20 el teñido fué efectuado durante 24 horas con azul brillante Coo-  
masie.

Con fines de comparación, se efectuaron experimen-  
tos con diferentes enzimas, tal como se muestra en la tabla si-  
guiente.

17.6.72  
FC

23 JUN 1972



403261

	Cantidades de enzima, $\mu$ g.	Distancia entre el límite entre el gel superior e inferior y el centro de la banda de proteínas, cm.
5	Enzima	
	Preparación de enzima según el Ejemplo	
	2	50
	Subtilisin Carlsberg	2,72
10	cristalino	50
	Subtilisin NOVO cristalino	1,70
	2	50
	Subtilisin NOVO cristalino	2,06

Todos los discos mostraban sólo una banda, lo que indica una alta pureza de las enzimas.

15 Como puede verse en la tabla anterior, las proporciones entre las distancias que aparecen en la última columna de la tabla son las siguientes:

Distancia, de la enzima según la invención = 1,60

Distancia, del Subtilisin Carlsberg

20 Distancia, de la enzima según la invención = 1,32

Distancia, del Subtilisin NOVO

25 Se han efectuado otros experimentos de electroforesis ácida en disco. Aunque los valores de las distancias que aparecen en la última columna de la tabla anterior pueden variar de un experimento a otro, se comprobó que las proporciones antes

403261



citadas son aproximadamente las mismas en todos los casos.

Para demostrar la extraordinaria utilidad de la enzima proteolítica como aditivo para detergentes, se efectuaron algunos ensayos de lavado con materiales textiles ensuciados artificialmente.

Los materiales textiles manchados usados en los ensayos eran piezas EMPA 116 usadas comúnmente en los ensayos de lavado. Son producidas y vendidas por Eidgenössische Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, St. Gallen, Suiza.

Las varias preparaciones de enzimas fueron evaluadas por medio de ensayos de lavado en el laboratorio por medio de un método de lavado en una sola operación efectuado en un Launder-O-mater, que es un aparato de lavado modelo tipo muy conocido.

En los procedimientos, las composiciones detergentes usadas fueron formuladas de modo que simulasen un polvo detergente para lavado reforzado tal como se usan en Europa.

Las condiciones de ensayo eran en general como sigue:

1. Material textil manchado:

Tamaño de las piezas 3,7 x 7,3 cm

Número de piezas por lavado 5 (= 3

gramos en total)

17.6.72  
FC

403261



2. Condiciones de lavado:

	Aparato	Laundry-Ometer
	Volumen de disolución de lavado	300 ml.
	Tiempo de lavado	33 minutos
5	Temperatura	25° a 90°C
	Concentración de detergente	5 g/litro
	Dureza del agua	10° alemanes.

Después del procedimiento de lavado, las piezas de tela de ensayo fueron enjuagadas, planchadas, y se tomó el valor de la reflectancia final con el fotómetro de reflexión ELREPHO, tomando el óxido de magnesio como patrón de 100% de blancura. Iluminación: lámpara incandescente. Filtro : R 46.

En el ensayo de lavado se usó un detergente con la siguiente composición:

15	Alcohol-bencenosulfonato lineal	11,0% en peso
	Jabón	3,0% "
	Carboximetilcelulosa sódica	1,0% "
	EDTA sódico (sal de Na <sub>4</sub> )	0,18% "
	Silicato de sodio	7,0% "
20	Tripolifosfato de sodio	38,0% "
	Perborato de sodio tetrahidrato	25,0% "
	Sulfato de sodio y agua, resto hasta	
	ta	100,0% "

Como enzimas se usaron las enzimas proteolíticas antes citadas según el Ejemplo 2, y como comparación una enzima

403261



según la Patente Británica N° 1.243.784.

El pH después del lavado era de 9,6.

Los resultados del ensayo antes citado se reñmen en la tabla siguiente. Las cifras son los valores de re-  
 5 flexión final totales indicados por R. Se han determinado los va-  
 lores de las diferencias entre los valores de reflexión de los  
 detergentes enzimáticos y el mismo sistema detergente sin la en-  
 zima proteolítica, y se indican por  $\Delta$  R. La actividad proteo-  
 lítica se expresa en Unidades Anson (UA). F es el factor de me-  
 10 jora en comparación con una de las mejores enzimas proteolíti-  
 cas alcalinas ya conocidas.

<u>Ensayo de lavado</u>				
<u>Enzima</u>	<u>UA por litro</u>	<u>R</u>	<u><math>\Delta</math> R</u>	<u>F</u>
Sin enzima	0,00	16,4		
15 Enzima según la in- vención	0,02	26,7	10,3	1,72
	0,04	31,0	14,6	1,85
	0,06	33,2	16,8	1,73
20 Enzima según la Pa- tente Británica N° 1.243.784	0,02	22,4	6,0	
	0,04	24,3	7,9	
	0,06	26,1	9,7	

Además se han realizado unos diez ensayos

17.6.72  
FC

403261



de lavado similares usando diferentes preparaciones proteolíticas de grado o pureza técnica, con actividades entre aproximadamente 2 y 5 UA/g. El factor de mejora F mostró en todos los casos un valor de entre 1,70 y 2,10.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 28 de Mayo de 1.971, bajo el número 18201/71 (Provisional), se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

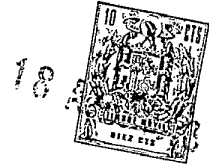
REIVINDICACIONES

10 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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un procedimiento para la preparación  
25 de una enzima proteolítica alcalina que tiene propiedades supe-

13.7.73  
PC

403261



5 riores como aditivo para agentes de limpieza y para agentes de-  
piladores, caracterizada por el hecho de que su pH de activi-  
dad óptima, determinado según el método de Anson con homoglobi-  
na desnaturalizada con urea, es de alrededor de 9,0, por el  
10 hecho de que su pH de actividad óptima con caseína como sustra-  
to es de alrededor de 11,0, de que su temperatura de actividad  
óptima, determinada según el método de Anson con hemoglobina des-  
naturalizada con urea, a un pH de 7,5, es de aproximadamente  
50°C, de que su temperatura de actividad óptima, determinada se-  
15 gún el método de Anson con hemoglobina no desnaturalizada con  
urea a pH 7,5, es de alrededor de 60°C, de que su pH de estabi-  
lidad óptima, determinado durante un tiempo de mantenimiento de  
10 minutos a 60°C, es de alrededor de 6,0, de que es estable a  
pH 10 hasta aproximadamente 50°C sin  $\text{Ca}^{++}$ , de que es estabiliza-  
15 da por el  $\text{Ca}^{++}$ , de que su actividad residual al cabo de 30 minu-  
tos con urea 6 molar a 50°C y pH 7,5 es de menos del 10 por cien-  
to, de que su actividad residual al cabo de 30 minutos a 50°C  
en presencia de STPP a pH 10 es inferior a aproximadamente 5  
por ciento, de que no es inhibida por el EDTA pero sí completa-  
20 mente inhibida por el PMSF, siendo por tanto una proteinasa de  
tipo serina que tiene serina en su centro activo, de que tiene  
las siguientes proporciones aproximadas entre unidades de este-  
resa y unidades Anson: 1105 (ATEE), 10 (BAEE), 10 (TAME) y 244  
(BLEE), de que sus constantes de Michaelis son de aproximadamen-  
25 te  $3 \times 10^{-2}$  M con ATEE como sustrato y aproximadamente 0,2 por

13.7.73  
FC

403261



ciento con hemoglobina desnaturalizada por urea como sustrato,  
de que da lugar a una distribución entre péptidos grandes y  
péptidos pequeños por hidrólisis total de la caseína de apro-  
ximadamente 83 por ciento de péptidos grandes y aproximada-  
mente 17 por ciento de péptidos pequeños, de que su peso mo-  
lecular es de aproximadamente 26.000, de que su punto isoeléctrico  
aproximado es pI = 11,0, de que su coeficiente de extinción  
es  $E_{279}^{1\%} = 11,5$ , y de que su actividad específica  
máxima obtenible es de 114 unidades Anson/g.  $\pm$  10 unidades  
Anson/g., determinada según una valoración con cinamofilo y con  
la suposición de que el peso molecular es 26.000, caracteriza-  
do por el hecho de cultivar el microorganismo Bacillus firmus,  
cepa NRS 783, aeróbicamente en condiciones sumergidas, conte-  
niendo el medio de cultivo fuentes adecuadas de carbono y de  
nitrógeno.

2ª.- Un procedimiento para la preparación  
de una enzima proteolítica alcalina según la reivindicación  
1ª, caracterizado por el hecho de efectuar el cultivo entre  
30 y 40°C, y en condiciones alcalinas.

3ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION  
DE UNA ENZIMA PROTEOLITICA ALCALINA.

Tal y como se ha descrito en la Memoria  
que antecede, representado en los dibujos que se acompañan

13.7.73  
FC



403261

y para los fines que se han especificado.

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

10 JUL 1973

Madrid,

5

P.A.

13.7.73 FC

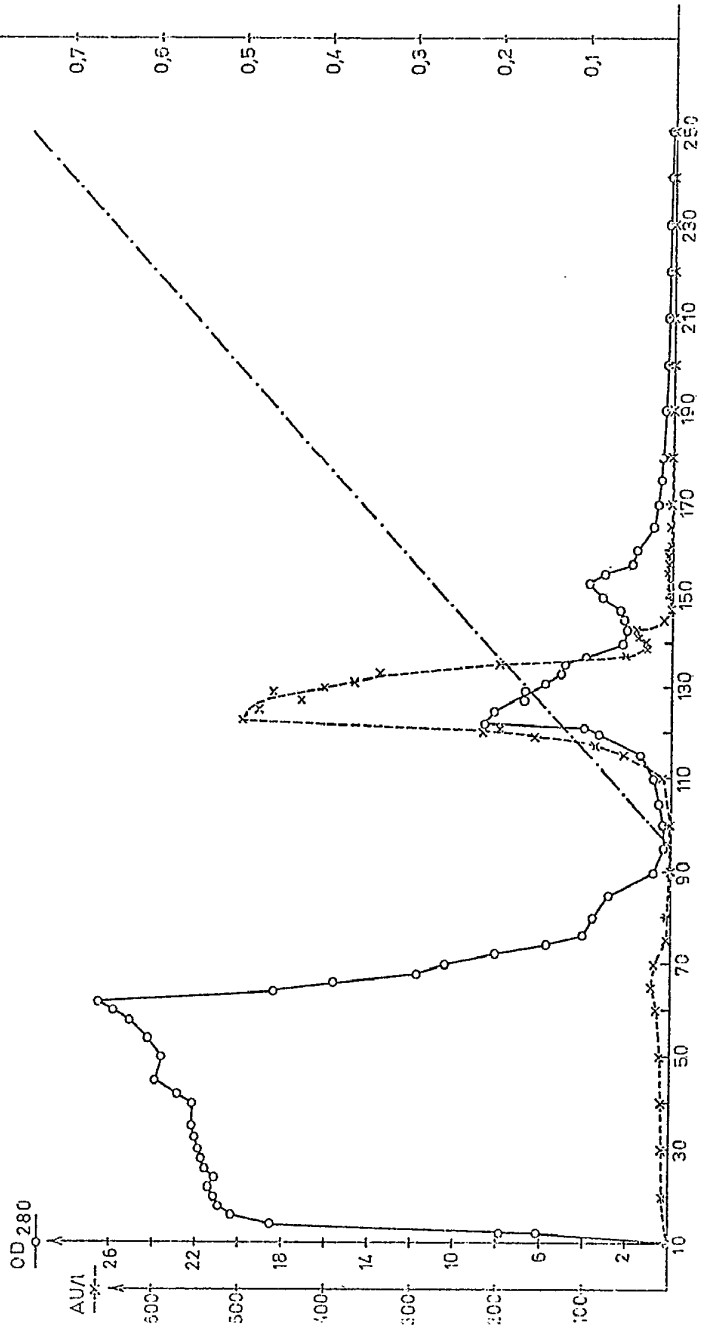
- 28 -



23

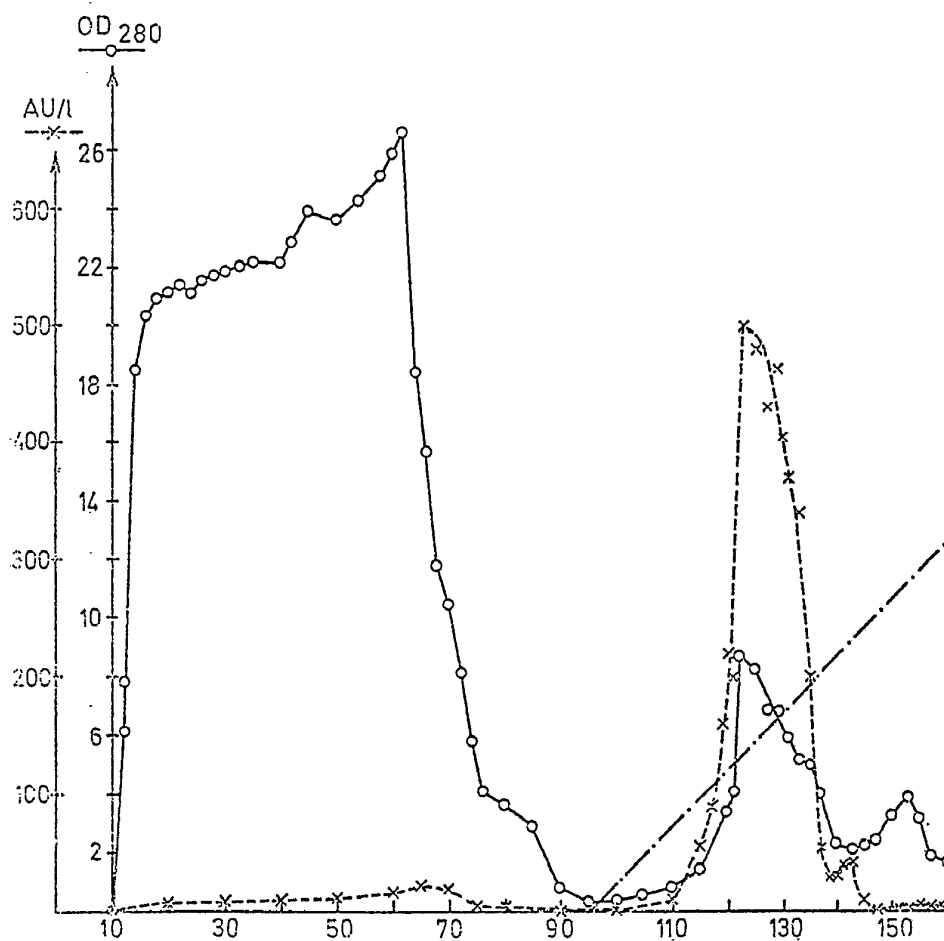
403261

403261



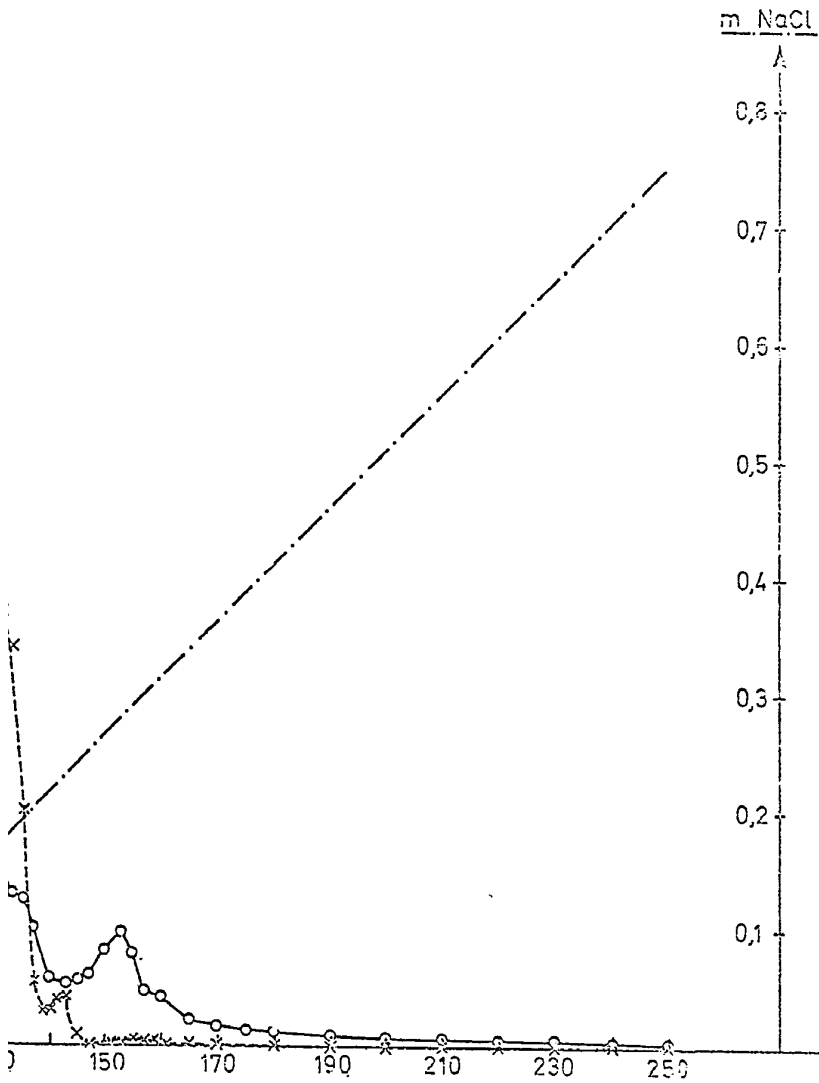
Alberto de Elizuru  
for Podiat

403261



403261

23



Alberto de Elizaburu  
Per Poder