



416813

CASE ES 4506

41000

Fc 16-6-75

Int. Cl.:	A23C

P A T E N T E
 D E
 I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA ESTABILIZAR Y PRECIPITAR SOLUCIONES ACUOSAS CONCENTRADAS DE PROTEASA", a favor de la firma alemana HENKEL & CIE. GMBH, residente en Henkelstrasse 67, DUSSELDORF (Alemania).

= ... =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Objeto de este invento es un procedimiento para la precipitación de soluciones concentradas de proteasa, en el cual, para evitar pérdidas de actividad, se procede a una estabilización de las proteasas por adición de lactoalbúmina y/o leche descremada seca, en polvo.

5.

Entre los muchos métodos conocidos para purificar las proteasas, el que más se ha acreditado es el que actúa por medio de un cambiador de iones. Para ello, la solución impurificada por colorantes y otras

10.

416813



- cargas (por ejemplo, un caldo de fermentación cargado de proteasas) se clarifica filtrándola con adición de las materias auxiliares usuales, se diluye y se adsorbe en un cambiador de iones. Después de lavar el cambiador y de eluir las proteasas con una solución salina o tamponada, se obtiene una solución de enzimas concentrada y muy pura. Esta solución concentrada de proteasas es inestable y con el reposo, pero sobre todo con la precipitación técnica acostumbrada con sulfato sódico, se
- 5.
- 10.
- produce en el curso de la elaboración.

- Se han descrito ya procedimientos para
- 15.
- estabilizar las proteasas en las soluciones acuosas de escaso contenido encimático. Así, según la patente norteamericana 3.296.094 se utiliza para la estabilización de soluciones acuosas de enzimas proteolíticas un colágeno hidrolizado y hecho soluble y glicerina. Sin embargo,
- 20.
- por tal procedimiento se necesitan cantidades tan grandes de glicerina, que por ese solo motivo para la estabilización de las soluciones de proteasa precipitables. Lo mismo cabe decir de la patente norteamericana 3.095.358, que propone efectuar la estabilización por medio de sorbita. Por otra parte, se ha propuesto ya para estabilizar soluciones diluidas de enzimas proteolíticas la
- 25.
- adición de propilenglicol, dietilenglicol, polietilenglicol, alcoholes inferiores, etéreoalcoholes inferiores, dialquilformamidas, tetrahidrofurano, dioxano y acetona.

416813

- 3 -



- Los experimentos con los agentes de estabilización aquí citados para las soluciones diluídas de enzimas proteolíticas han demostrado que no son aptos para estabilizar una solución concentrada de proteasa,
5. obtenida por purificación en cambiadores de iones, que siguiendo a la purificación ha de ser precipitada. De los agentes de estabilización conocidos, únicamente el dietilenglicol manifestó una acción estabilizante utilizable; pero al ser empleado en las cantidades necesarias para la estabilización, causa dificultades en
10. la precipitación de la enzima. Durante la precipitación usual de las proteasas, por medio de sulfato sódico, del eluato concentrado se producen, cuando está presente el dietilenglicol, precipitados gelatinosos, que
15. prácticamente ya no son filtrables. En consecuencia, los procedimientos conocidos para estabilizar las soluciones diluídas de enzimas proteolíticas no podían contribuir a resolver el problema actual, de la estabilización de las soluciones concentradas de proteasa
20. durante la elaboración.

- Ahora se ha descubierto que la estabilización y la precipitación de las soluciones acuosas concentradas de proteasas pueden realizarse con muy buenos resultados si se añaden a las soluciones, como agente estabilizador, lactoalbúmina y/o leche descremada seca, en
25. polvo, y se precipita la enzima por adición de sal (en particular, de sulfato sódico), a temperatura elevada.

Las proteasas, a las cuales puede apli-

416813

12



- cararse el procedimiento conforme a este invento, se derivan generalmente de hongos y bacterias. La aplicación de este procedimiento a otras enzimas proteolíticas que proceden de fuentes animales y vegetales es posible en principio, pero requiere, por las diferentes propiedades y el distinto comportamiento de tales productos, modificaciones especiales. Las enzimas proteolíticas de actividad relativamente alta que son pasibles de este procedimiento pueden obtenerse por cultivo de
5. microorganismos de diversos géneros; por ejemplo, razas del género Fusarium, Giberella, Streptomyces, Aspergillus, Penicillium, Cytophage, Arthrobacter, Serratia, Pseudomonas y Bacillus. El procedimiento tiene especial importancia para la estabilización y
10. la precipitación de las proteasas alcalinas, como, por ejemplo, la aminopeptidasa, la carboxipeptidasa, la queratinasa, la elastasa, la aspergilopeptidasa, la subtilisina y similares. Pero el campo preferido de aplicación de este procedimiento es la estabilización y
15. la precipitación de las soluciones alcalinas de proteasa que, a través de soluciones de fermentación purificadas por medio de cambiadores de iones y concentradas, proceden de cultivos de las especies Bacillus subtilis y Bacillus licheniformis.
- 20.
25. En el curso de la elaboración de tales soluciones de fermentación procedentes de cultivos de Bacillus subtilis o Bacillus licheniformis, se adsorbe en cambiadores de iones la proteasa de la solución filtrada o centrifugada, que está todavía impurificada por

416813

- 5 -



- colorantes y otras cargas. Para ello se utilizan diversos cambiadores de cationes; por ejemplo, a base de resinas de acrilato, resinas de metacrilato, polimerizados degradados por grupos de ácido sulfónico
5. (como el poliestireno), carboximetilcelulosa especialmente tratada, etc. La solución concentrada de proteasa que se obtiene después de lavar de cambiador mediante elución con una solución salina o tamponada, se trata con lactoalbúmina y/o leche descremada seca. La cantidad de estabilizador que se ha de emplear oscila
 10. entre 2 y 20 % en peso (preferentemente, 5 a 15% en peso) respecto a la solución de proteasa concentrada que se ha de estabilizar. La precipitación de las proteasas de estas soluciones estabilizadas se realiza
 15. en la práctica mediante salificación (por ejemplo, con cloruro sódico, sulfato amónico o cloruro cálcico, pero en particular con sulfato sódico), a temperatura elevada (35 a 40°C). Con este tipo de precipitación queda normalmente en las aguas madres menos del 0,5%
 20. de la actividad, por lo que el fuerte descenso de actividad que se observa en la precipitación de las soluciones de proteasa no estabilizadas, debe atribuirse a la inactivación de la enzima durante el mantenimiento en solución concentrada en el curso de la elaboración y
 25. a causa del proceso de precipitación.

Mientras en las soluciones de proteasa no estabilizadas y las tratadas con los estabilizadores usuales hasta ahora hay que consignar una regresión de la actividad en la solución y una regresión de la

416813

12 30



- enzima activa precipitada que alcanza alrededor de un tercio hasta la mitad de la actividad inicial, con la adición de estabilizadores según este invento la actividad se mantiene casi al mismo nivel y la regresión, aún en circunstancias desfavorables, es inferior al 10%.

5. Los ejemplos que siguen tiene por objeto explicar el invento con mas detalles, pero sin limitarlo a ellos.

EJEMPLOS

10. En un cambiador de carboximetilcelulosa reticulada se adsorbió, a pH 6,0 (tampón de fosfato), una solución filtrada y diluida de proteasa, que se habia obtenido por cultivo de una especie de Bacillus subtilis, y luego se la eluyó a pH 7,0 con un tampón
15. de fosfato sódico 0,1 molar. La solución concentrada de proteasa que se obtuvo, con una actividad de 33,5 Mio. de unidades de proteasa por litro, se guardo a temperatura de 37°C durante 20 horas, en varias muestras sin adición de estabilizador y con adición de diversos estabilizadores. Transcurrido dicho tiempo, se midió en las diversas muestras la actividad remanente y se calculó su relación porcentual a la actividad inicial. Los índices que así se obtuvieron están consignados en la tabla que sigue. En esta tabla, las cantidades añadidas de
20. cada estabilizador están indicadas en porcentaje de peso referido a la solución concentrada de proteasa.
- 25.

416813

- 7 -

12



TABLA 1

5.	Estabilizador añadido	Actividad remanente (en % de la actividad inicial) después de 20 horas de reposo a 37°C)
	Ensayo de control, sin aditivo	54
	0,2 % de caseína Hammersten	50
	1 % de gelatina blanca	52
	10 % de acetato sódico	58
10.	10 % dietilenglicol	66
	20 % dietilenglicol	90
	10 % de D-glucosa	56
	5 % de lactoalbúmina	92
	10 % de leche descremada seca, en polvo	100

15. De la tabla se desprende inequívocamente la superior acción estabilizante de la leche descremada seca y de la lactoalbúmina, que sólo se alcanza aproximadamente con grandes cantidades de dietilenglicol.

20. Sin embargo, para la utilidad de un aditivo estabilizador no sólo importa la actividad en la solución, sino que existen factores esenciales, constituidos por la influencia en la precipitación de la enzima tanto en el aspecto de la pérdida de actividad que se produce como en el de la precipitación completa y el de la filtrabilidad del precipitado producido. Para

25. investigar el comportamiento de los diversos estabilizadores en las condiciones de la precipitación, unas muestras de la solución concentrada de proteasa citada

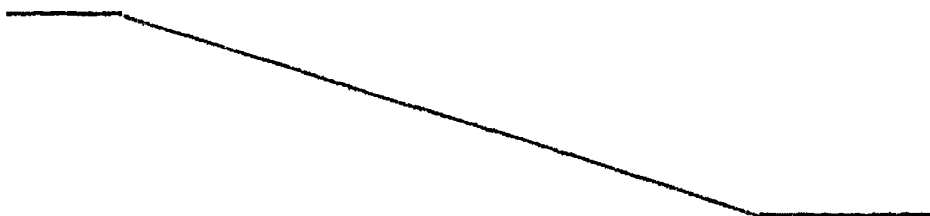
416813

= 8 =

12



- antes, de una actividad inicial de 33,5 Mio. de unidades de proteasa por litro, sin adición de estabilizador y con adición de diversos estabilizadores, se trataron, a temperatura de unos 37 a 40° C y en agitación, con
5. 25 % en peso de sulfato sódico anhidro (respecto a la solución concentrada de proteasa) y al cabo de 20 a 30 minutos se separó por filtración el precipitado formado. De la proteasa sólida obtenida se extrajo el agua por liofilización, y para cerciorarse de que la
10. precipitación era completa, se midió la actividad remanente en las aguas madres. Para poder juzgar de las pérdidas de actividad durante la precipitación se determinaron las cantidades y las actividades de las proteasas sólidas obtenidas y se las expresó en
15. relación porcentual a la respectiva actividad inicial de la solución precipitada. Se obtuvieron así los índices que figuran en la tabla que sigue. En esta tabla, las cantidades añadidas de cada estabilizador están indicadas a su vez en porcentajes de peso, referido a
20. la solución concentrada de proteasa. La actividad hallada en las aguas madres, que constituye una medida de la compleción de la precipitación, se expone como porcentaje de la actividad inicial.





416813

Tabla 2

	Estabilizador añadido	Actividad de las aguas madres (en % del eluato)	Rendimiento de enzima seca precipitada (en % del grado de actividad en el eluato concentrado)
5.	Ensayo de control sin aditivo	0,5	65
	10% de dietilenglicol	10	68, mala filtración
	20% de dietilenglicol	-	precipitado gelatinoso, infiltrable
10.	10% de D-glucoosa	0,8	62
	5% de lactoalbúmina	0,3	93
	10% de leche descremada seca en polvo	0,4	98

15. La tabla demuestra que en el proceso de precipitación la acción estabilizante de la lactoalbúmina y de la leche descremada seca es superior a la del dietilenglicol y que por motivos de la técnica precipitatoria la estabilización con dietilenglicol queda descartada.

20. Experimentos semejantes a los efectuados con la solución de proteasa obtenida del cultivo de una especie de Bacillus subtilis se realizaron con una solución de proteasa obtenida por cultivo de una variedad del Bacillus licheniformis, raza P 300 (solicitud de patente alemana P 20 63 988.7) y elaboración correspondiente. La solución concentrada de proteasa tenía una actividad inicial de 36 Mio. de unidades de proteasa por litro. El significado de los índices que fi-

25.

416813

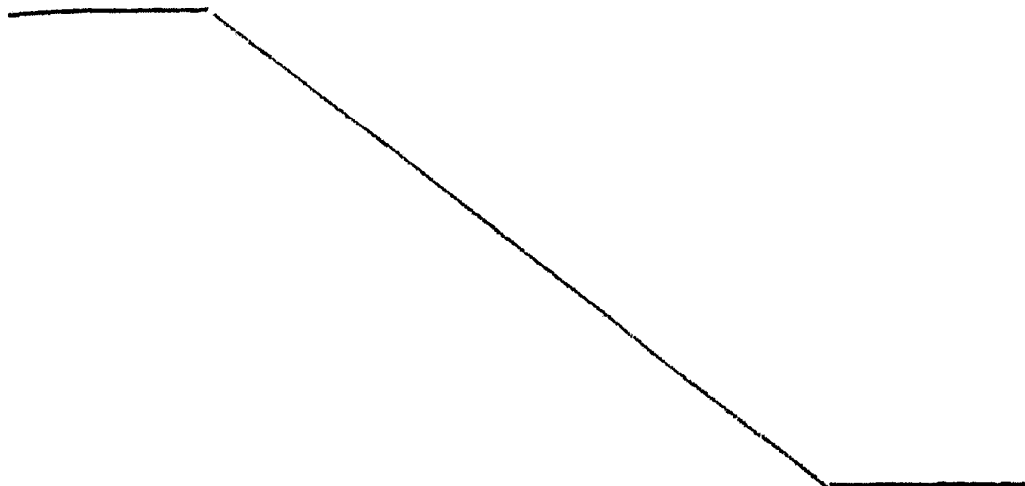


guran en la Tabla 3 que sigue es el mismo que el de los índices de la tabla 1

Tabla 3

5.	Estabilizador añadido	Actividad remanente (en % de la actividad inicial) después de 20 horas de reposo a 37°C
	Ensayo de control sin aditivo	60
	10% de dietilenglicol	65
	20% de dietilenglicol	87
10.	10% de D-glucosa	62
	5% de lactoalbúmina	97
	10% de leche descremada seca en polvo	100

Los ensayos de precipitación efectuados con la solución de proteasa obtenida por cultivo de *Bacillus licheniformis*, raza P 300, dieron los índices que figuran en la tabla 4 que sigue



416813

- 11 -



Tabla 4

	Estabilizador añadido	Actividad de las aguas madres (en % del eluato)	Rendimiento de enzima seca precipitada (en % del grado de actividad en el eluato concentrado)
5.	Estabilizador añadido	0,6	62
	10% de dietilenglicol	7	74
	20% de dietilenglicol	-	gelatinoso, no filtrable
	10% de D-glucosa	1,5	65
10.	5% de lactoalbúmina	0,5	94
	10% de de leche descremada seca, en polvo	0,4	96

15. Los ensayos efectuados con la solución de proteasa procedente de cultivos de la raza P 300 confirman la actividad superior de la lactoalbúmina y de la leche descremada seca, en polvo, para estabilizar las soluciones alcalinas de proteasa durante el almacenamiento y durante la precipitación de la enzima.

20. La determinación de la actividad proteolítica de las proteasas en la solución concentrada y en la substancia seca precipitada y la medición de la actividad remanente se realizaron por un procedimiento desarrollado en los laboratorios de Henkel & Cie. GmbH, de Düsseldorf, el cual se describe con todo detalle en la revista "Tenside", Año 7, fascículo 3 (1970), páginas 125 a 132. El principio con que actúa este método de determinación es, en resumen, el siguiente:

25.

416813



- Se deja actuar la enzima o el producto enzimático, en agua de 15° de dureza alemana, en presencia de tripolifosfato sódico y en condiciones establecidas, sobre caseína patrón. Se interrumpe la reacción añadiendo/ácido tricloraocético y se precipita la caseína no degradada. Después de filtrar, se determina la extinción del filtrado contra una muestra en blanco en la que se ha impedido la degradación enzimática por aplicación de una cantidad suficiente de ácido tricloraocético. La extinción medida, emanante de las porciones aromáticas (en particular, tirosina) de los productos de degradación solubles en ácido tricloraocético diluido, sirve de medida de la actividad enzimática. En la práctica se procede midiendo la extinción del filtrado de la muestra en el máximo de 275 milimicras contra el de la muestra en blanco con un espesor de capa de 1 cm. De la extinción hallada se subtrae el índice medido en las 300 milimicras. La diferencia ΔE sirve en la fórmula para calcular la actividad en unidades de proteasa (PE) por gramo de preparado enzimático. Esta deducción tiene por objeto eliminar todo lo posible la eventual influencia de la distinta turbidez de la muestra y de la muestra en blanco. La actividad en unidades de proteasa por gramo de preparado enzimático resulta ser así: $PE/g = \Delta E \cdot \text{factor de dilución/espesor de capa (cm)} \cdot 20$, donde el factor de dilución = volumen de la solución enzimática preparada (cc) / pesada (g). Como definición para la unidad de actividad enzimática resulta que una preparación de enzimas tiene una actividad de proteasas

416813

- 13 -

12 JUL 1973



de 1.000 unidades cuando una solución de 1 g de la preparación de enzimas en 100 cc de una diferencia de extinción de 0,500.

5. La ventaja del procedimiento de este invento consiste predominantemente en que con él se logra preparar con muy buen rendimiento a partir de los eluatos concentrados del cambiador de iones cargados de proteasa, por precipitación, una proteasa muy pura y de gran actividad.

- . . -

N O T A

10. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente alemana nº P 22 34 412.3 del 13.7.72.

15. 1. Procedimiento para estabilizar y precipitar soluciones acuosas concentradas de proteasa, caracterizado por combinarse las soluciones, con un agente estabilizador, del tipo lactoalbúmina y/o leche descremada seca, en polvo, y precipitarse la enzima a temperatura alta, por adición de sal (en particular, de sulfato sódico).

20. 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por utilizarse el agente estabilizador en cantidad de 2 a 20% en peso, y particularmente de 5 a 15% en peso, respecto a la solución concentrada de proteasa que se haya de estabilizar.

25.

416813

- 14 -

12



3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por estabilizarse y precipitarse soluciones de proteasas alcalinas.

5. 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por utilizarse como soluciones de proteasa soluciones de fermentación de Bacillus subtilis purificadas por medio de cambiadores de iones y concentradas.

10. 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por utilizarse como soluciones de proteasa soluciones de fermentación de Bacillus licheniformis purificadas por medio de cambiadores de iones y concentrados.

6. Procedimiento para estabilizar y precipitar soluciones acuosas concentradas de proteasa.

15. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 14 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 12 de Julio 1973

p.a.

JAIME ISERN

p. p.

Firmado: JOSE F. NIETO