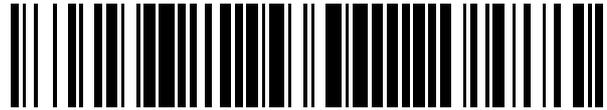


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 937**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

B01D 15/04 (2006.01)

B01D 61/14 (2006.01)

B01J 39/04 (2006.01)

B01J 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2005 E 05710256 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1717311**

54 Título: **Proceso para producir lactoperoxidasa**

30 Prioridad:

17.02.2004 JP 2004039704

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.02.2013

73 Titular/es:

**MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (100.0%)
33-1, SHIBA 5-CHOME
MINATO-KU, TOKYO 108-8384, JP**

72 Inventor/es:

**ICHIHASHI, NOBUO;
YAMAUCHI, KOJI;
SHIN, KOUICHIROU y
ANDO, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 395 937 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para producir lactoperoxidasa

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un proceso para producir lactoperoxidasa de pureza elevada a partir de materiales lácteos. Se reivindica prioridad de la solicitud de patente japonesa nº 2004-039704, presentada el 17 de febrero de 2004.

10

Técnica antecedente

La lactoperoxidasa es una oxidorreductasa contenida en leche de mamíferos como la leche de vaca y otras secreciones como la saliva, fluido lacrimonal y mucosidad del tracto respiratorio (por ejemplo, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, EE.UU., vol. 166, 2002, p. S57 a S61). La lactoperoxidasa es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 80.000. La lactoperoxidasa tiene heme como una coenzima por una molécula. Como la longitud de onda de absorción máxima de esta heme es de aproximadamente 412 nm, la lactoperoxidasa altamente purificada exhibe un color marrón (por ejemplo, British Journal of Nutrition, Inglaterra, vol. 84, 2000, p. S19 a S25).

20

Está descrito que la lactoperoxidasa tiene diversas funciones biológicas como propiedades antibacterianas, actividad antiviral, actividad antioxidativa, actividad anticancerígena y actividad inmunorreguladora (por ejemplo, dicho British Journal of Nutrition, Inglaterra, vol. 84, 2000, p. S19 a S25, y Life Sciences, Inglaterra, vol. 43, 1988, p. 739 a 745), y se ha puesto de manifiesto que esta es una proteína muy importante en relación con la defensa del hospedantes. En relación a la aplicación industrial de esta lactoperoxidasa, se han descrito técnicas tales como: uso de lactoperoxidasa, donante de peróxido y tiocianato para la fabricación de un medicamento para tratar una infección de helicobacter pylori (por ejemplo, traducción japonesa publicada nº 2000-509367 de PCT); un agente preventivo y terapéutico para una enfermedad infecciosa con gérmenes patógenos añadidos a la alimentación formulada para animales acuáticos cultivados (por ejemplo, patente japonesa nº 3103615); un agente para prevenir el envejecimiento (por ejemplo patente japonesa nº 3103167); un agente mejorador de la función hepática (por ejemplo, solicitud de patente japonesa sin examinar, primera publicación, nº 2001-226289), aplicaciones profilácticas y terapéuticas de peroxidases (por ejemplo, traducción japonesa publicada nº H06-501453 de PCT) y un agente terapéutico para un trastorno corneal (por ejemplo, patente japonesa nº 2840795). Además, se han descrito técnicas por los presentes inventores como para: una composición inactivante de ureasa y una bebida (por ejemplo, solicitud de patente japonesa sin examinar, primera publicación, nº 2002-238554) y un agente mejorador de la flora intestinal y alimento y bebida (por ejemplo, solicitud de patente japonesa sin examinar, primera publicación, nº 2003-246753).

25

30

35

40

Se describen métodos de purificación para lactoperoxidasa a escala de laboratorio en: Acta Chemica Scandinavica, Dinamarca, vol. 23, 1969, p. 171 a 184; FEBS Letters, Holanda, vol. 110, 1980, p. 200 a 204; y Journal of Chromatography, Holanda, vol. 795, 1998, p. 277 a 287.

45

Como un método típico para ello, es conocido un método para: añadir un ácido como ácido clorhídrico a la leche, para precipitar isoeléctricamente caseína, con el fin de preparar suero lácteo que sirve como una materia sobrenadante; poner en contacto el suero lácteo obtenido con un intercambiador de cationes, con el fin de adsorber la lactoperoxidasa con carga positiva en el suero lácteo en el intercambiador de cationes y, a continuación, lavar el intercambiador de cationes con una solución tamponante con bajo contenido de sal y seguidamente de sorber la lactoperoxidasa con una solución tamponante con elevado contenido de sal.

50

En un método de purificación a escala de laboratorio, con el fin de mejorar la pureza de la lactoperoxidasa, se usa generalmente un método para usar una columna que está rellena de forma muy densa con un intercambiador de cationes en forma de gel que tiene partículas de diámetro pequeño y el paso a velocidad elevada a través de la misma se realiza con una bomba a presión elevada (por ejemplo, Journal of Chromatography, Holanda, vol. 795, 1998, p. 277 a 287).

55

Por otra parte, si una columna se rellena con un intercambiador de cationes que tenga partículas de diámetro relativamente grande y el paso a través se realiza por medio de un goteo natural sin una bomba a presión elevada, requiere más tiempo (por ejemplo, Acta Chemica Scandinavica, Dinamarca, vol. 23, 1969, p. 171 a 184 y FEBS Letters, Holanda, vol. 110, 1980, p. 200 a 204).

60

Junto con el reciente progreso en técnicas de aislamiento a escala industrial, resulta posible aislar y purificar una sustancia bioactiva de pureza elevada contenida en la leche, para una producción en masa. En la mayoría de los casos, es realmente difícil realizar a escala un método de purificación de proteínas optimizado a escala de laboratorio y llevarlo a una escala industrial como tal. Una de las causas principales es que las características de propiedades de un intercambiador de cationes o una columna generalmente usados en un laboratorio no son necesariamente adecuadas para un tratamiento en masa de una materia prima.

65

Además, como la adición de aditivos a los materiales lácteos tiende a cambiar el sabor y las propiedades físicas de

la leche, no es preferible usar aditivos para purificar una proteína a partir de materiales lácteos. Además, si se usa una gran cantidad de aditivos con el fin de lavar un intercambiador de cationes y/o para desorber una proteína del intercambiador de cationes, resulta necesario separar estos aditivos a partir de la proteína purificada y se hace complicado el proceso de producción.

5 Como un proceso de producción para resolver estos problemas en la producción en una proteína de pureza elevada a partir de materiales lácteos, ya se ha propuesto por el presente solicitante un proceso de producción para lactoferrina bovina de pureza elevada 8por ejemplo, solicitud de patente japonesa examinada, segunda publicación, nº H06-13560).

10 En lo que se refiere al proceso de protección industrial para lactoperoxidasa, se ha descrito lo que sigue.

15 En la memoria descriptiva de la patente de EE.UU. nº 4667018, se describe un proceso para purificar proteínas como lactoferrina y lactoperoxidasa a partir de leche o su derivado lácteo. En este proceso se describe un método parado. Poner en contacto la leche o su derivado lácteo con un intercambiador de cationes que comprende polisacáridos catiónicos; lavar el intercambiador de cationes con una solución con bajo contenido de sales y seguidamente desorber las proteínas del intercambiador de cationes con una solución de elevado contenido de sales. Sin embargo, como las proteínas producidas en el método descrito en este documento de patente son obtenidas en forma de una mezcla, la pureza no es elevada y hay un problema en cuanto no puede ser producida
20 lactoperoxidasa de pureza elevada.

25 En la patente japonesa nº 2985158 se describe un método para recuperar una fracción de lactenina que tiene una pureza elevada. En este método descrito en este documento de patente, como la lactoperoxidasa es obtenida como un componente que constituye lactenina y contenido en una mezcla de proteínas, hay también un problema en cuanto no puede ser producida lactoperoxidasa de pureza elevada.

30 En la memoria descriptiva de la patente europea nº 0518448, como método para aislar proteínas a partir de la leche, se describe un método para usar un portador de quelato metálico. En este método, como la proteína aislada es una mezcla que comprende inmunoglobulina, lactoferrina y lactoperoxidasa, hay un problema en cuanto es imposible producir lactoperoxidasa de pureza elevada.

35 En la patente japonesa nº 3403066, se describe un método para recuperar un factor de proliferación celular o una composición que contiene uno o más tipos de factores de proliferación celular a partir de leche o un derivado lácteo. Sin embargo, como la composición obtenida en este método es una mezcla, hay también un problema en cuanto no es un proceso para producir lactoperoxidasa de pureza elevada.

40 En la patente Japonesa nº 2710283, como método para extraer selectivamente una proteína metálica a partir de suero lácteo, se describe un método que comprende una etapa de poner en contacto suero lácteo con partículas porosas inorgánicas (partículas de sílice) revestidas con dextrano que comprende grupos carboxilos o grupos sulfónicos. La pureza de la lactoperoxidasa producida en este método es de aproximadamente 50% como máximo y hay un problema, en cuanto que, con el fin de producir latoperoxidasa de pureza elevada, es necesario aumentar la pureza en otra etapa.

45 En la patente japonesa nº 2553180, se describe un proceso para extraer fracciones puras de lactoperoxidasa y lactoferrina a partir de suero lácteo. En este proceso, como un medio para resolver el problema de la obstrucción provocada por un cambio de volumen de un intercambiador de cationes, se usa un suero lácteo microfiltrado como material lácteo. En este proceso, como no se usa ningún material lácteo distinto del suero lácteo, hay un problema de una estrecha gama de aplicación. Además, es necesaria también una microfiltración como un pretratamiento de los materiales lácteos, complicando la etapa de producción. Además de ello, es usado un intercambiador de cationes
50 fuerte para el intercambiador de cationes y la lactoperoxidasa y lactoferrina son selectivamente desorbidas por soluciones tamponantes que tienen diferentes concentraciones de sales. Este proceso requiere, con el fin de lavar el intercambiador de cationes y desorber selectivamente proteínas, que el pH de las soluciones tamponantes necesariamente sea ajustado y, por lo tanto, es usada una gran cantidad de aditivos para preparar estas soluciones tamponantes. Además de ello, hay diversos problemas en cuanto que es necesario separar los aditivos de las
55 proteínas purificadas, lo que sirve como un factor para complicar adicionalmente la etapa.

60 En la patente japonesa nº 2686831, se describe un método para separar y purificar una proteína de unión a hierro usando un portador de afinidad de polisacáridos inducido de grupos sulfonas fuertemente catiónicos como un intercambiador de cationes. En este método, se produce una lactoperoxidasa con una pureza relativamente elevada (pureza de 85%). Sin embargo, en una etapa para lavar el intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción, es esencial un tratamiento de lavado con una solución tamponante ajustada a pH 5 o menos. Además de ello, se requieren soluciones tamponantes que tengan respectivamente concentraciones de sales de pH 5 o menos para desorber selectivamente lactoperoxidasa y lactoferrina.

65 En la solicitud de patente japonesa sin examinar, primera publicación, nº H05-202098, se describe un proceso para producir una sustancia bioactiva a partir de materiales lácteos, una técnica que puede usar un intercambiador de cationes fuerte que tenga grupos sulfonas y un intercambiador de cationes débil que tenga grupos carboxilos. Sin

embargo, en este método, hay todavía un problema en cuanto que se requiere una solución tamponante de pH 5 o menos para hacer posible el lavado del intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción y para desorber selectivamente lactoperoxidasa.

5 En la patente de EE.UU. nº 5596082, se describe un proceso para aislar lactoferrina y lactoperoxidasa a partir de leche y productos lácteos. En esta patente, con el fin de hacer posible el paso a través de leche y productos lácteos a un caudal elevado, se usa un gel físicamente estable que tiene partículas de diámetro grande como un intercambiador de cationes. En este proceso, hay también un problema en cuanto que se requiere un ajuste del pH usando una solución tamponante para lavar el intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción y
10 desorber selectivamente lactoperoxidasa. Como no hay ninguna descripción de la pureza de la lactoperoxidasa producida en esta patente, No está claro si puede ser producida lactoperoxidasa altamente purificada.

Como se describió anteriormente, en la mayoría de los procesos convencionales para producir lactoperoxidasa, la lactoperoxidasa recuperada a partir de materiales lácteos es producida en forma de una mezcla con otras proteínas y no se diseña la pureza sea suficientemente elevada. Además de ello, con el fin de aumentar la pureza de la lactoperoxidasa, son necesarias otras etapas de purificación, requiriendo así tiempo y costes de producción para las mismas.
15

Además de ello, incluso en el proceso de producción en el que la pureza de la lactoperoxidasa resulta relativamente superior, hay también un problema en cuanto que se requiere un ajuste del pH en las etapas respectivas para desorber selectivamente la lactoperoxidasa contenida en materiales lácteos, lavar el intercambiador de cationes y desorber selectivamente proteínas, requiriendo así el uso de una gran cantidad de aditivos.
20

Divulgación de la invención

25 Los presentes inventores han estudiado a fondo el modo de resolver los problemas anteriores. Como consecuencia, han encontrado un proceso que posibilita la producción industrial de lactoperoxidasa de pureza elevada directamente elevada a partir de materiales lácteos, sin realizar un ajuste del pH, en todas las etapas de producción, realizando etapas de tratamiento que usan un método de intercambio de iones y un método de membrana de ultrafiltración, y han completado así la presente invención.
30

Es decir, un proceso para producir lactoperoxidasa de la presente invención comprende: una etapa (1) para poner en contacto uno o más materiales lácteos con un intercambiador de cationes que tiene grupos débilmente ácidos como grupos de intercambio de iones para efectuar así un tratamiento de adsorción; una etapa (2) para lavar el intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción; una etapa (3) para poner en contacto el intercambiador de cationes lavado con un disolvente de lixiviación que tiene una resistencia iónica de 0,07 a 0,3 y eluye lactoperoxidasa, para obtener así una solución de lixiviación que tiene lactoperoxidasa eluida en el disolvente de lixiviación; una etapa (4) para concentrar la solución de lixiviación a través de una membrana de ultrafiltración, de forma que un contenido de proteínas en dicha solución de lixiviación concentrada resulte ser de 0,9 a 15% para efectuar así la precipitación de proteínas como impurezas en la solución de lixiviación concentrada y una etapa (5) para obtener una solución de lactoperoxidasa separando la precipitación de proteínas como impurezas a partir de la solución de lixiviación concentrada.
35
40

Mejor modo de llevar a cabo la invención

45 Se da a continuación una descripción detallada de ejemplos preferidos de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos preferidos, y puede ser libremente modificada dentro del alcance de la presente invención.

50 La presente invención aborda problemas y situaciones de las técnicas convencionales en consideración, con el objeto de proporcionar un proceso para producir lactoperoxidasa, que haga posible la producción de lactoperoxidasa altamente purificada con una etapa más simple, durante un período de tiempo más corto, a un coste inferior al de los procesos convencionales, mientras se evita el cambio en la composición y la calidad de los materiales lácteos, en que el cambio ha sido producido debido al uso de aditivos y que puede ser aplicada a una fabricación a escala industrial.
55

Seguidamente se proporciona una descripción de condiciones preferidas y efectos obtenidos en la presente invención.

60 En la presente invención, preferentemente una capacidad de adsorción de lactoferrina del intercambiador de cationes, cuando se ponen 10 ml del intercambiador de cationes en 1 kg de leche desnatada sin calentar, es de 85 mg/10 ml o más.

Los grupos de intercambiador de iones son preferentemente grupos carboximetilos.

65 En la etapa (4), preferentemente la concentración se realiza de forma que el contenido de proteínas en la solución de lixiviación resulte ser de 0,9 a 15%, para efectuar así la precipitación.

Preferentemente, la resistencia iónica del disolvente de lixiviación usado en la etapa (3) es de 0,07 a 0,3.

5 Preferentemente, el disolvente de lixiviación usado en la etapa (3) es una solución acuosa que contiene al menos una seleccionada entre un grupo de sales que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio.

10 Preferentemente se proporciona de forma adicional una etapa para obtener lactoperoxidasa sólida separando el disolvente de la solución de lactoperoxidasa obtenida en la etapa (5).

Preferentemente, la pureza de la lactoperoxidasa sólida obtenida en la etapa anterior es de 80% o más.

15 En la presente invención, cuando la lactoperoxidasa adsorbida en el intercambiador de cationes es eluida en el disolvente de lixiviación, la lactoperoxidasa es obtenida en una mezcla con otras fracciones (impurezas). Seguidamente, cuando se realiza una concentración usando una membrana de ultrafiltración, las otras fracciones (impurezas) son selectivamente aisladas y separadas mediante la diferencia de solubilidad. Como consecuencia, puede ser obtenida lactoperoxidasa de pureza elevada.

20 Por lo tanto, según la presente invención, pueden ser obtenidos los siguientes efectos:

(1) La lactoperoxidasa puede ser selectivamente recuperada mientras pasa a través de una etapa que requiere un ajuste del pH.

25 (2) puede ser producida lactoperoxidasa de pureza elevada en una etapa sencilla, durante un período de tiempo corto y a un coste inferior.

(3) es ventajoso desde el punto de vista de reducir el coste ya que no se requiere ninguna solución tamponante ni ninguna cantidad grande de aditivos.

30 (4) puede ser evitado el cambio en la composición y la calidad de los materiales lácteos debido al uso de aditivos.

(5) Puede ser fácilmente aplicado a escala industrial.

35 (6) Puede ser ampliamente aplicado a materiales lácteos distintos del suero lácteo, como una materia prima que va a estar en contacto con el intercambiador de cationes.

A continuación se proporciona una descripción más detallada de ejemplos preferidos de la presente invención.

40 En lo que respecta al contenido de proteínas en la presente memoria descriptiva, el contenido de nitrógeno en una muestra se midió mediante el método de Kjeldahl y es indicado como un porcentaje que fue convertido usando un factor de conversión de nitrógeno/proteína de 6,38.

45 Además de ello, la pureza de la lactoperoxidasa fue analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se indicó como una relación (porcentaje) de área del pico de lactoperoxidasa con respecto al área del pico total derivada de las proteínas en la muestra.

En la presente memoria descriptiva, el porcentaje distinto de proteínas anteriormente mencionado y la pureza se obtienen basados en el peso, salvo que se explique específicamente.

50 Como los materiales lácteos que pueden ser usados en la presente invención, pueden ser usado cualquiera que contenga al menos lactoperoxidasa. Por ejemplo, pueden ser usados, leche, leche desnatada, suero lácteo y similares, derivados de mamíferos como un ser humano, una vaca, un búfalo acuático, una oveja, una cabra y un caballo. Entre ellos, preferentemente se usa uno tratado bajo un estado de tratamiento de calor suave o sin calentar. Además de ello, puede ser usada una solución que tenga polvo de leche desnatada, polvo de leche entera, polvo de suero lácteo, condensado de proteínas de suero lácteo (WPC), aislado de proteína de suero lácteo (WPI) y similares disueltos en agua o una solución tamponante. Además de ello, puede ser usada una materia sobrenadante a partir de la cual puede ser separada caseína mediante precipitación en el punto isoeléctrico, o mediante el cuajo o un requesón purgados en el momento de la producción de queso. Estos materiales lácteos pueden ser usados incluso sin separar previamente las precipitaciones mediante un dispositivo de decantación o mediante operaciones como microfiltración y filtración.

En la presente invención, en particular, se produce preferentemente lactoperoxidasa bovina usando materiales lácteos derivados de la vaca como el material lácteo.

65 El material lácteo puede ser usado aisladamente o puede ser usada una pluralidad de tipos del mismo en combinación. Se proporciona seguidamente una descripción del proceso de producción de la presente invención.

(1) en primer lugar se pone en contacto el material lácteo con un intercambiador de cationes para efectuar así el tratamiento de adsorción. Se usa un intercambiador de cationes que tenga grupos débilmente ácidos como grupos de intercambio de iones. Como el grupo de intercambio de iones débilmente ácido, es posible seleccionar cualquier grupo de intercambio de iones opcionalmente en la medida en que el grupo pueda funcionar como un grupo de intercambio de iones adecuados que tenga una finalidad dirigida. Ejemplos de grupo de intercambio iónico débilmente ácido incluye un grupo carboxilo, un grupo carboximetilo, un grupo fenol y similares. Preferentemente es un grupo carboximetilo.

El intercambiador de cationes no está específicamente limitado y puede ser opcionalmente seleccionado en la medida necesaria. Ejemplos de intercambiadores preferidos incluyen partículas porosas que comprenden polisacáridos reticulados (como agarosa, dextrano y celulosa), un gel de sílice hidrófilo, un polímero sintético y similares, que son introducidos con grupos de intercambio de iones débilmente ácidos. Como ejemplos específicos de los mismos se pueden usar preferentemente SEPABEADS FP-CM13 (grupos de intercambio: grupo carboximetilo, preparado por la empresa Mitsubishi Chemical Corporation), CM-Sephadex C-50 (grupos de intercambio: grupo carboximetilo, preparado por Amersham plc.) y CM-Sepharose-FF (grupos de intercambio: grupo carboximetilo, preparado por la empresa Amersham plc.)

La forma, tamaño, estado superficial, material y similares del intercambiador de cationes son opcionales y se pueden seleccionar en la medida necesaria. Ejemplos de modo de uso incluyen una columna previamente rellena en la que ya ha sido introducida una resina de intercambiador de cationes y un medio como una columna en la que se introducen gránulos de resina de intercambiador de cationes. En estos casos, se usa preferentemente un tipo de intercambiador de cationes en combinación con un recipiente, desde el punto de vista de la conveniencia. Sin embargo, cuando sea necesario, una pluralidad de recipientes respectivamente rellenos con gránulos de resina pueden estar conectados en serie o en paralelo para realizar una cromatografía. La forma del recipiente puede ser seleccionada en la medida necesaria. Sin embargo, preferentemente la forma es fácil de lavar y proporciona muchas caras de contacto a los gránulos de resina o similares contenidos. Además de ello, la pared interna tiene preferentemente una superficie lisa sin rugosidad. Específicamente, pueden ser usadas preferentemente formas que tengan una cara circular como una forma tubular (forma cilíndrica y de varilla) y una forma cónica como la forma de los recipientes. El material del recipiente puede ser opcionalmente seleccionado, sin embargo, puede ser usado preferentemente un acero inoxidable, un vidrio, polipropileno, polietileno, poli(tereftalato de etileno), policarbonato, una resina acrílica y similares. El tamaño del recipiente se puede seleccionar apropiadamente según la escala de tratamiento y puede ser opcionalmente seleccionado entre escalas como varios centímetros cúbicos hasta varios metros cúbicos. Las columnas previamente rellenas disponibles en el comercio que pueden ser preferentemente usadas en la presente invención incluyen HIPREP 10/16CM FF (grupos de intercambio: grupo carboximetilo, preparado por la empresa Amersham plc.) y serie CM-TOYOPEARLPAK650 (grupos de intercambio: grupo carboximetilo, preparado por la empresa Tosoh Corporation).

En este caso, con el fin de aumentar la velocidad de recuperación de lactoperoxidasa, preferentemente, en las siguientes etapas, cuando el intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción se pone en contacto con un disolvente de lixiviación, las proteínas adsorbidas en el intercambiador de cationes son fácilmente desorbidas y eluidas en el disolvente de lixiviación. Por lo tanto, en la presente invención, preferentemente las proteínas en los materiales lácteos no están unidas demasiado fuertemente al intercambiador de cationes. En un intercambiador de cationes que tiene grupos fuertemente ácidos como grupos de intercambio de iones, los grupos de intercambio de iones son disociados en un amplio intervalo de pH. Por otra parte, en un intercambiador de cationes que tiene grupos débilmente ácidos como grupos de intercambio de iones, la carga eléctrica varía dependiendo del pH. Como consecuencia, tiene una propiedad de hacer variar la capacidad de unión de las proteínas y, por tanto, es adecuado en el proceso de producción de la presente invención. En la presente invención, se puede definir que un grupo de intercambio de iones que tiene una constante de disociación ácida de menos de 3 es un grupo fuertemente ácido y un grupo de intercambio de iones que tiene una constante de disociación ácida de 3 o más es un grupo débilmente ácido. Un ejemplo del grupo fuertemente ácido incluye un grupo sulfónico y un ejemplo del grupo débilmente ácido incluye un grupo carboximetilo.

Además de ello, la escala de porosidad y capacidad de adsorción del intercambiador de cationes usado en la presente invención pueden ser selectivamente seleccionadas. Además de ello, la capacidad de adsorción con respecto a una proteína que tenga aproximadamente el mismo punto isoelectrico y peso molecular que los de la lactoperoxidasa, específicamente, una proteína que tenga un peso molecular de 70 a 90 kDa y un punto isoelectrico de 7 a 9, puede ser indicada como un índice. Entre ellas, la capacidad de adsorción con respecto a lactoferrina (peso molecular: aproximadamente 80 kDa y punto isoelectrico: aproximadamente 8) es indicada preferentemente como un índice. La capacidad de adsorción de un intercambiador de cationes con respecto a lactoferrina puede ser obtenida, por ejemplo mediante un método descrito en la solicitud de patente japonesa examinada, segunda publicación, nº H06-13560.

Es decir, un intercambiador de cationes de tipo sodio es hinchado con agua para constituir 10 ml, que seguidamente es puesto en 1 kg de leche desnatada sin calentar (pH 6,7). La solución mezclada del mismo es agitada a 4°C durante 16 horas. Seguidamente, el intercambiador de cationes es preparativamente aislado y lavado con agua. El intercambiador de cationes lavado se pone en contacto con 150 ml de solución acuosa de cloruro de sodio con una concentración de 10%, con el fin de eluir lactoferrina del intercambiador de cationes en la solución acuosa de cloruro

de sodio. El contenido de lactoferrina en el material recogido obtenido mediante esta elución es medido mediante el método de Lowry (Analytical Biochemistry, EE.UU., vol. 15, 1966, p. 45 a 52) y se calcula así la capacidad de adsorción (unidad: mg/10 ml).

5 Mediante la selección de un intercambiador de cationes que tenga una capacidad de adsorción de lactoferrina superior medida mediante el método anterior, puede ser aumentada la cantidad de lactoperoxidasa recuperada mediante el método de la presente invención. Es decir, es preferentemente un intercambiador de cationes que tenga una capacidad de adsorción de lactoferrina de 70 mg o más cuando se ponen 10 ml de intercambiador de cationes en 1 kg de leche desnatada sin calentar según el método anterior, más preferentemente un intercambiador de cationes que tenga una capacidad de adsorción de lactoferrina de 85 mg o más e incluso más preferentemente un intercambiador de cationes que tenga una capacidad de adsorción de lactoferrina de 90 mg o más. El valor de la capacidad de adsorción es preferentemente superior. Generalmente, el contenido de lactoferrina en 1 kg de leche es de aproximadamente 100 mg y un intercambiador de cationes capaz de adsorberlo en su totalidad es ideal. Específicamente, la capacidad de adsorción del SEPABEADS FP-CM13 anteriormente mencionado es de 85 mg/10 ml y la capacidad de adsorción de lactoferrina del CM- SEPABEADS C-50 es de 91 mg/ 10 ml. Estos dos son intercambiadores de cationes que muestran una capacidad de adsorción de lactoferrina elevada.

El tratamiento de adsorción (contacto) de los materiales lácteos y el intercambiador de cationes puede ser opcionalmente seleccionado. El tratamiento de adsorción puede ser realizado mediante un método tal como un método de agitación discontinua y un proceso continuo en columna. En la medida en que los materiales lácteos y el intercambiador de cationes puedan estar suficientemente en contacto uno con otro, puede ser realizado cualquier tratamiento. Puede ser realizado un tratamiento, o se puede realizar una pluralidad de tratamientos de adsorción en combinación.

25 En el caso del tratamiento de tipo discontinuo, apropiadamente, se usa una gran cantidad de intercambiador de cationes en un caso de que sea deseado una gran cantidad de rendimiento a partir de una cantidad fija de material lácteo, y se usa una gran cantidad de material lácteo en el caso de que se desee una gran cantidad de rendimiento con una cantidad fija de intercambiador de cationes. La relación de volúmenes de mezcla de los materiales lácteos y el intercambiador de cationes en el tratamiento de tipo discontinuo puede ser opcionalmente ajustada según la capacidad de adsorción del intercambiador de cationes y/o un método específico de tratamiento de adsorción.

En este caso, la propiedad del intercambiador de cationes es ampliamente clasificada en dos tipos de tipo duro y tipo blando. En la presente invención, puede ser usado cualquier tipo.

35 En el tipo duro, el volumen de intercambiador de iones en sí mismo es duramente cambiado debido a la resistencia iónica o pH. Además, incluso si la presión del intercambiador de cationes es cambiada debido al cambio en el caudal o similar, el volumen del intercambiador de cationes en sí mismo es duramente cambiado. Por lo tanto, el tipo duro es más adecuado para el proceso continuo en columna en el que el intercambiador de cationes es mantenido en una columna y el paso a través de la misma se realiza a un caudal elevado.

40 Por otra parte, en el intercambiador de cationes de tipo blando, el volumen del propio intercambiador de iones es ampliamente alterado debido a la resistencia iónica o pH. Además de ello, si la presión en el intercambiador de cationes es alterada debido al cambio en el caudal o similar, el volumen del propio intercambiador de cationes es fácilmente alterado. Por lo tanto, el mantenimiento del intercambiador de cationes de tipo blando en una columna y la realización del paso a través de la misma a un caudal elevado es dificultoso. En particular, en el caso en que se haga pasar a través de la misma leche desnatada, suero lácteo o similar, se provoca una gran pérdida de presión en la capa del intercambiador de cationes en comparación con un caso en el que se haga pasar a través otra solución de sales o similar. Por lo tanto, el intercambiador de cationes de tipo blando es adecuado para el método discontinuo.

50 El SEPABEADS FP-CM13 (fabricado por la empresa Mitsubishi Chemical Corporation) es un tipo duro y el CM-Sephadex C-50 (fabricado por la empresa Amersham pic.) es un tipo blando.

55 En lo que respecta a la temperatura para el tratamiento de adsorción de los materiales lácteos y el intercambiador de calor, hay una preocupación creciente sobre un aumento en la viscosidad o congelación de los materiales lácteos si es menor que 0°C y hay una probabilidad de desnaturar lactoperoxidasa si sobrepasa los 60°C. Por lo tanto, el tratamiento se realiza preferentemente en un intervalo entre 0°C y 60°C. Incluso si es entre 25°C y 60°C, en el caso de que se requiera un tiempo prolongado para la adsorción, o similar, puede haber una probabilidad de desnaturar gradualmente la lactoperoxidasa. Por lo tanto, el tratamiento se realiza preferentemente, en particular de 0°C a 25°C. Además de ello, si se usa un material lácteo sin calentar, el tratamiento se realiza deseablemente de 0°C a 10°C con el fin de evitar la propagación bacteriana.

65 En lo que respecta al tiempo para el tratamiento de adsorción (tiempo de contacto) de los materiales lácteos y el intercambiador de calor, las condiciones pueden ser apropiadamente seleccionadas considerando la temperatura en el momento de tratamiento de adsorción, el método de tratamiento de adsorción que va a ser empleado (proceso de tipo discontinuo o continuo de columna) y similares. Por ejemplo, en el caso del tipo discontinuo, el tiempo para el tratamiento de adsorción de los materiales lácteos y el intercambiador de calor es preferentemente 1 minutos o más

pero 24 horas o menos y, más preferentemente, 10 minutos o más pero 6 horas o menos. Además de ello, en el caso de un proceso continuo de columna, el caudal lineal es preferentemente de 10 cm/h o más pero 1.000 cm/h o menos.

5 (2) Seguidamente, el intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción es lavado. En cuanto a la solución limpiadora en este momento, es preferentemente lavado con agua teniendo en cuenta el coste de producción, aunque es posible usar una solución acuosa con bajo contenido de sales que tenga una resistencia iónica de menos de 0,07 o una solución tamponante en una zona neutra o débilmente ácida.

10 Para el intercambiador de cationes después del tratamiento de adsorción, los materiales lácteos usados pueden ser lavados y separados mediante cualquier método. Por ejemplo, puede ser de forma que solamente el intercambiador de cationes es transferido desde el recipiente que contiene los materiales lácteos y el intercambiador de cationes y seguidamente el intercambiador de cationes es lavado en otro lugar, o puede ser de forma que solamente el material lácteo es transferido desde el recipiente y seguidamente el intercambiador de cationes es lavado en el recipiente.

15 (3) seguidamente, el intercambiador de cationes lavado se pone en contacto con un disolvente de lixiviación. Como consecuencia, la lactoperoxidasa es eluida del intercambiador de cationes en el disolvente de lixiviación y se obtiene la solución de lixiviación.

20 La resistencia iónica del disolvente de lixiviación usado en esta etapa está preferentemente en un intervalo de 0,07 o más pero 0,3 o menos, más preferentemente 0,10 o más, pero 0,25 o menos e incluso más preferentemente 0,15 o más, pero 0,22 o menos. Usando el disolvente de lixiviación que tiene una resistencia iónica en el intervalo anterior, la lactoperoxidasa puede ser eficazmente eluida desde el intercambiador de cationes.

25 Como el disolvente de lixiviación, se puede usar también una solución tamponante en una zona neutra o débilmente ácida, usando la resistencia iónica ajustada en el intervalo anterior. Considerando el coste de producción, más preferentemente, puede ser usada una solución acuosa (solución de sales) que tenga solamente sales disueltas. En lo que respecta a las sales que pueden ser usadas en la presente invención puede ser opcionalmente un tipo o una combinación de una pluralidad de tipos.

30 La solución de sales preferida es una solución acuosa de una o unas sales que comprenden un tipo o una mezcla de una pluralidad de tipos seleccionados entre un grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y similares.

35 (4) Seguidamente, se realiza un tratamiento de membrana sobre la solución de lixiviación obtenida por medio de un método de separación de membrana a través de una membrana de ultrafiltración. Como consecuencia, la solución de lixiviación es concentrada, para efectuar así la precipitación en la solución de lixiviación.

40 El método de funcionamiento de la membrana de ultrafiltración puede ser clasificado en dos de ellos; un método de ultrafiltración normal de dejar agua y los componentes que tienen un peso molecular de no más del peso molecular pretendido que va a ser aislado, penetrar para separarlo y un método de filtración de agua de alimentación (diáfiltración) de funcionamiento continuo mientras se añade agua en la misma cantidad que las materias penetradas que han penetrado a través de la membrana, en la materia retenida en la membrana. Ambos métodos pueden ser usados en la presente invención. En particular, este último método de filtración de agua de alimentación es más preferido desde el punto de vista de que se puede realizar una desalación al mismo tiempo que la concentración, y los componentes de bajo peso molecular de la materia retenida pueden ser separados en un grado elevado.

45 Cuando se usa el primer método de ultrafiltración normal, la desalación se realiza preferentemente mediante un método como diálisis y filtración en gel, después de la ultrafiltración.

50 Para la membrana de ultrafiltración, puede ser usada cualquier membrana de ultrafiltración disponible en el comercio. Ejemplos específicos de las mismas incluyen la membrana IRIS3038, membrana IRIS3072 (ambas fabricadas por la empresa Rhone-Poulenc S.A.) y membrana GR-61 pp (fabricada por la empresa DSS inc.).

55 Para el material de la membrana de ultrafiltración puede ser usado cualquier material orgánico o material inorgánico y puede ser seleccionado considerando el coste, generalidad y similares.

60 La temperatura de la solución de lixiviación en el momento de tratamiento de ultrafiltración es factible en la medida en que no sea mayor que la temperatura de resistencia al calor de la membrana que va a ser usada (por ejemplo, 80°C o menos en el caso de la membrana GR-61 pp). Sin embargo, la lactoperoxidasa puede ser posiblemente desnaturalizada si está a 60°C o más y la propagación bacteriana tiende a ser significativa en un intervalo entre 10 y 60°C. Por lo tanto, se realiza preferentemente en un intervalo entre 0 y 10°C.

65 En lo que respecta a la presión en el momento de la ultrafiltración, es posible cualquier presión en la medida en que no sea mayor que el límite de prueba de presión de la membrana que va a ser usada (por ejemplo, 0,6 MPa o menos en el caso de la membrana GR-61 pp). Como un uso alrededor del valor del límite de prueba presión puede acortar posiblemente el tiempo debida de la membrana, la ultrafiltración puede ser realizada preferentemente a una

presión de 2/3 del límite de prueba de presión (por ejemplo, 0,4 MPa o menos en el caso de una membrana GR-61 pp) o menos.

5 Para el módulo de la membrana de ultrafiltración que va a ser usado, es posible cualquier tipo como un tipo tubular, un tipo de fibra hueca, un tipo de película lisa y un tipo en espiral. Sin embargo, en un módulo como un módulo de tipo de fibra hueca que es de tipo de presión interna, si se genera una precipitación en el interior de la fibra hueca, el paso puede resultar posiblemente obstruido y, por lo tanto, la ultrafiltración se realiza preferentemente considerando la presión y similares.

10 La solución de lixiviación obtenida en la etapa (3) es preferentemente una solución marrón clara. Además de ello, cuando esta solución de lixiviación es concentrada a través de una membrana de ultrafiltración, debido a la diferencia en la solubilidad de proteínas, precipitan proteínas distintas de lactoperoxidasa en forma de una precipitación en la materia retenida sobre la membrana de ultrafiltración. En este caso, con el fin de precipitar eficazmente proteínas distintas de lactoperoxidasa, es decir, proteínas como impurezas, la concentración se realiza preferentemente de forma que el contenido de proteínas en la solución de lixiviación concentrada resulte 0,9% o más. Si el contenido de proteínas en la solución de lixiviación sobrepasa un 15%, hay una preocupación sobre un aumento en la viscosidad de la solución de lixiviación y, por tanto, una disminución en la eficacia del tratamiento de membrana de ultrafiltración. Por lo tanto, el contenido de proteínas en la solución de lixiviación concentrada está preferentemente en un intervalo entre 0,9 y 15%, más preferentemente entre 1,5 y 12% y, lo más preferentemente, entre 3 y 10%.

20 Disponiendo las condiciones en las etapas respectivas hasta que se genera la precipitación, puede ser reducida la cantidad de lactoperoxidasa mezclada en la precipitación y es posible también generar una precipitación que no contenga lactoperoxidasa en absoluto.

25 (5) Seguidamente, la precipitación se separa de la solución de lixiviación (materia retenida) en la que ha sido generada la precipitación. Como consecuencia, las proteínas separadas como impurezas son de la solución de lixiviación y se obtiene una solución (solución de lactoperoxidasa) que contiene lactoperoxidasa altamente purificada.

30 El método para separar la precipitación es opcionalmente seleccionado. Puede ser un método para separar la precipitación dejando en reposo la solución de lixiviación (materia retenida) en la que ha sido generada la precipitación, o puede ser un método de recoger una solución clarificada (solución de lactoperoxidasa) a partir de la cual ha sido separada la precipitación, realizando un proceso de clarificación por medio de centrifugación, filtración precisa (microfiltración) o similar.

35 La solución de lactoperoxidasa obtenida mediante esta etapa es preferentemente esterilizada en la medida necesaria. En este momento, desde el punto de vista de aumentar la estabilidad térmica de la lactoperoxidasa, la esterilización se realiza preferentemente de forma que los iones de calcio como cloruro de calcio son añadidos para constituir la concentración de aproximadamente 20 mM, y la esterilización con calor se realiza a 72°C durante aproximadamente 15 a 90 segundos.

45 (6) Seguidamente, la lactoperoxidasa sólida puede ser obtenida separando el disolvente de la solución de lactoperoxidasa obtenida.

El método de separar el disolvente no está específicamente limitado y puede ser seleccionado en la medida necesaria. Por ejemplo, puede ser adecuadamente usado un método de concentrar adicionalmente usando una membrana de ultrafiltración y liofilizar mediante un método normal, con el fin de separar la humedad. Como consecuencia, puede ser producido un polvo de lactoperoxidasa altamente purificado.

50 La lactoperoxidasa sólida obtenida de esta manera puede conseguir una pureza elevada de 80% o más.

La etapa (6) de separar el disolvente no es esencial. La solución de lactoperoxidasa obtenida en forma de lactoperoxidasa altamente purificada en la etapa (5) puede ser usada como tal en estado de solución.

55 Ejemplos

Seguidamente se proporciona una descripción detallada de la presente invención mostrando ejemplos de ensayo. Sin embargo, la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos. Por ejemplo, en la presente solicitud, los componentes en estos ejemplos y los componentes no incluidos en los ejemplos pueden ser apropiadamente combinados. Además de ello, excepto para el contenido de proteínas y la pureza, % indica tanto por ciento en peso salvo que se describa específicamente.

65 Ejemplo de ensayo 1

El presente ensayo se realizó para examinar las condiciones preferibles para producir la precipitación en la etapa (4), que se llevó a cabo siguiendo las etapas (1) a (3) para generar una precipitación en el concentrado mediante la

concentración de la solución de lixiviación recogida del intercambiador de cationes débilmente ácido, a través de una membrana de ultrafiltración.

(1) Muestra

5 Como un intercambiador de cationes débilmente ácido, se usó el CM-Sephadex C-50 (fabricado por la empresa Amersham plc.) que tenía grupos carboximetilo y una capacidad de adsorción de lactoferrina de 91 mg/ 10 ml.

10 A una columna rellena con 170 ml de intercambiador de cationes débilmente ácido se añadieron 20 litros de leche desnatada, con el fin de adsorber proteínas en el intercambiador. Seguidamente, el intercambiador de cationes débilmente ácido en la columna se lavó con agua, seguidamente se añadieron a la columna 200 ml de solución acuosa de cloruro de sodio al 1,6% (resistencia iónica 0,27) como disolvente de lixiviación con el fin de que las proteínas que habían sido adsorbidas en el intercambiador de cationes débilmente ácido se eluyeran en la solución acuosa de cloruro de sodio. Se usaron aproximadamente 200 ml de solución de lixiviación recogida como la muestra de ensayo. El contenido de proteínas en la muestra de ensayo obtenida se midió mediante el método de Kjeldahl y era de 0,26%.

(2) Método de ensayo

20 Se prepararon tres tipos de unidades de filtro de ultrafiltración de tipo centrífugo (peso molecular fraccionado: 10 K dalton, 30 K dalton y 50 K dalton, todos los cuales se fabricaron por la empresa Millipore Corporation).

25 Se añadieron 0,5 ml de muestra del ensayo a cada unidad de filtración y se realizó la ultrafiltración mediante centrifugación a 6.000 rpm. Seguidamente, se observó la presencia/ausencia de generación de precipitación. En este momento, controlando el tiempo de centrifugación, se cambió el volumen de la materia retenida en el filtro por fases.

(3) Resultado del ensayo

30 Como un resultado del presente ensayo, en una cualquiera de las tres unidades de filtración que tenían diferentes pesos moleculares fraccionados, cuando el volumen de la materia retenida en la unidad de filtración se concentró hasta 0,15 ml, se observó una precipitación blanca en el filtro. Cuando el volumen de la materia retenida era de 0,15 ml o menos, se observó también generación de precipitación. Sin embargo, cuando era de más de 0,15 ml, no se observó precipitación.

35 Además de ello, cuando el volumen de materia retenida se concentró hasta 0,15 ml, el contenido total de proteínas en la materia retenida era de 0,9%.

40 A partir de este resultado, se confirmó que cuando la concentración se realizó de forma que el contenido total de proteínas en la materia retenida concentrada resultó ser de 0,9%, se generó la precipitación en la materia retenida.

Ejemplo de ensayo 2

45 El presente ensayo se realizó para examinar el efecto de un tratamiento de desalación sobre la solubilidad de la precipitación generada mediante la concentración usando la membrana de ultrafiltración.

(1) Muestra

50 Para la muestra del presente ensayo, se usó una muestra de ensayo similar a la del ejemplo de ensayo 1 (solución de lixiviación que tenía proteínas eluidas en solución acuosa de cloruro de sodio al 1,6%, contenido de proteínas: 0,26%).

(2) Método de ensayo

55 Se prepararon tres unidades de celdas agitadas (fabricadas por la empresa Millipore Corporation) unidas a una membrana de ultrafiltración de peso molecular fraccionado de 30 K dalton. Cada unidad de celda estaba unida a 50 ml de muestra de ensayo. Usando gas nitrógeno, se presurizó el interior de la unidad de celada hasta aproximadamente MPa y la materia retenida en la unidad de celda se concentró hasta 10 ml.

60 En lo que respecta a la primera celda, cuando la materia retenida resultó ser de 10 ml, la cantidad completa de la materia retenida en la unidad de celda fue transferida a un tubo de centrifugadora y se separó en sólido y líquido mediante centrifugación a 10.000 rpm. Seguidamente se recogió la precipitación (muestra 1 de precipitación).

65 En lo que respecta a la segunda celda, cuando la materia retenida resultó ser de 10 ml, la cantidad completa de la materia retenida en la unidad de celda fue transferida a un tubo de centrifugadora y se separó en sólido y líquido mediante centrifugación a 10.000 rpm. Seguidamente se recogió la precipitación. A la precipitación se añadieron 10 ml de agua purificada y se agitó por medio de un mezclador vorticial durante 1 minuto. La suspensión de la

precipitación obtenida de esta manera se llevó a un tubo de centrifugadora y se separó adicionalmente en sólido y líquido mediante centrifugación a 10.000 rpm. Seguidamente, se recogió la precipitación (muestra 2 de precipitación).

- 5 En lo que respecta a la tercera celda, se añadieron 40 ml de agua purificada a la unidad de celda que contenía la materia retenida hasta 10 ml. Seguidamente se presurizó análogamente a la vez anterior, hasta que la materia retenida se concentró nuevamente hasta 10 ml. Cuando la materia retenida resultó ser de 10 ml, la cantidad completa de la materia retenida en la unidad de celdas se transfirió al tubo de centrifugadora y se separó en sólido y líquido mediante centrifugación a 10.000 rpm. Seguidamente se recogió la precipitación (muestra 3 de precipitación).

10 El peso en seco de las muestras 1 a 3 de precipitación se midió mediante un método normal.

(3) Resultado del ensayo

- 15 Como un resultado del presente ensayo, en cualquier celda, cuando la materia retenida en la unidad de celda era de 10 ml, se formó una precipitación en la materia retenida.

Además de ello, casi no hubo diferencia en el peso de las muestras 1 a 3 de precipitación. Consecuentemente, se confirmó que, incluso si se añadía agua purificada a la precipitación que se había formado una vez mediante la etapa de concentración, la precipitación no se volvió a disolver.

20 Además de ello, se confirmó que la precipitación que se había formado una vez en la solución de lixiviación, no estuvo afectada incluso si el nivel de sales se cambiaba mediante desalación, y la precipitación no se volvió a disolver.

25 Seguidamente se proporciona una descripción más detallada de la presente invención mostrando ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

30 Se usó un intercambiador de cationes débilmente ácido, CB-sephadex-C-50 (fabricado por la empresa Amersham plc.) que tenía grupos carboximetilo y una capacidad de adsorción de latoferrina de 91 mg/10 ml.

35 Se introdujeron 17 litros de este intercambiador de cationes en una columna que tenía un diámetro interno de 50 cm y se hicieron pasar 40 litros de solución acuosa de cloruro de sodio al 1,5% a través de la columna. Seguidamente se lavó con agua y el intercambiador de cationes en la columna se ajustó en la forma de sodio.

40 Se preparó leche desnatada (pH 6,7, muestra 1 descrita con posterioridad) a partir de una vaca como el material lácteo. Se hicieron pasar 2.000 litros de esta leche desnatada a través de la columna bajo las condiciones de una temperatura de 4°C y un caudal de 60 litros / h, para efectuar así el tratamiento de adsorción.

Se hizo pasar agua a través de la columna después del tratamiento de adsorción, con el fin de lavar los componentes lácteos que no habían sido específicamente adsorbidos en el intercambiador de cationes.

45 Seguidamente se hicieron pasar 20 litros de solución acuosa de cloruro de sodio al 1,6% (resistencia iónica 0,27) a medida que se hacía pasar el disolvente de lixiviación a un caudal de 30 litros/h, con el fin de eluir las proteínas adsorbidas en el intercambiador de cationes. Como consecuencia, se recogieron 21 litros de la solución de lixiviación (muestra 2 descrita con posterioridad) que contenía lactoperoxidasa bovina.

50 Seguidamente, se sometieron a ultrafiltración 21 litros de la solución de lixiviación usando una membrana de ultrafiltración (fabricada por la empresa DDS Inc.) usando un peso molecular fraccionado de 20 k dalton, a una presión media de 0,3 MPa y se realizó una concentración hasta que la cantidad de materia retenida resultó ser de dos litros.

55 Seguidamente, se realizó adicionalmente una ultrafiltración mientras se añadía agua, con el fin de desalar la materia retenida y finalmente se recogieron 2 litros de la materia retenida. Se generó una precipitación blanca en la materia retenida.

60 Seguidamente, la materia retenida que contenía la precipitación blanca se dejó en reposos para clarificar y se recogieron 1,95 litros de la fracción sobrenadante (muestra 3 descrita con posterioridad) en forma de solución de lactoperoxidasa bovina.

65 La fracción sobrenadante recogida (solución de lactoperoxidasa bovina) se sometió a microfiltración usando una membrana de filtración precisa que tenía un tamaño de poros de 1,4 µm, para separar adicionalmente cantidades más pequeñas de precipitación y se produjo la preparación purificada que contenía lactoperoxidasa bovina.

Además de ello, la preparación purificada obtenida fue liofilizada, para producir 26 g de preparación liofilizada en

polvo (muestra 4 descrita con posterioridad) que contenía lactoperoxidasa bovina.

En lo que respecta a las muestras anteriores 1 a 4 obtenidas durante las etapas de producción, es decir muestra 1: leche desnatada (material lácteo), muestra 2: solución de lixiviación a partir del intercambiador de cationes, muestra 3: fracción sobrenadante de materia retenida después del tratamiento con membrana de ultrafiltración y muestra 4: preparación liofilizada, el contenido de proteínas y la actividad de lactoperoxidasa bovina se midieron para cada una para obtener la actividad específica. En este caso, el contenido de proteínas se midió mediante el método de Kjeldahl y la actividad de lactoperoxidasa bovina se midió mediante el método de Putter y otros (Bergmeyer ed, Methods of Enzymatic Analysis, tercera edición, vol. 3, 1983, p. 286 a 293), para obtener la actividad de peroxidasa (actividad específica) por 1 mg de proteína. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Muestra	Contenido de proteína (%)	Actividad específica (unidad/mg)
Muestra 1	3,30	0,2
Muestra 2	0,26	132,5
Muestra 3	1,64	220,3
Muestra 4	92,30	224,4

Como se muestra en la tabla 1, el contenido de proteínas de la muestra 1 era de 3,30% y su actividad específica era de 0,20 unidades/mg. Además de ello, el contenido de proteínas de la muestra 2 era de 0,26% y su actividad específica era 132,5 unidades/mg. A partir de estos resultados, se entiende que, entre las proteínas en la leche desnatada (material lácteo), la lactoperoxidasa bovina fue selectivamente eluida en la solución de lixiviación.

Además de ello, el contenido de proteínas de la muestra 3 era de 1,64% y su actividad específica era de 220,3 unidades/mg. La actividad específica de la muestra 4 era de 224,4 unidades/mg.

Comparando los resultados de la muestra 2 y las muestras 3 y 4, concentrando la solución de lixiviación usando la membrana de ultrafiltración y separando la precipitación generada, se aumenta considerablemente la actividad específica de la lactoperoxidasa bovina. Como consecuencia, se entiende que, mediante esta separación de la precipitación, se separan eficazmente proteínas en forma de impurezas distintas de lactoperoxidasa bovina, y se aumenta la eficacia de purificación de lactoperoxidasa bovina.

Además de ello, haciendo referencia a la muestra 4 (preparación liofilizada), la pureza de la lactoperoxidasa se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución.

En este análisis, se usó un aparato de HPLC equipado con una columna SHODEX ASAHIPAK C4P-50 y un detector de absorción ultravioleta que tenía una longitud de onda de ensayo de 280 nm. En lo que respecta a la fase móvil, el caudal fue de 0,8 ml/min y la elución se realizó mediante un método de gradiente de densidad lineal que tenía un cambio de concentración en el que la relación de A:B se cambió desde 50:50 hasta 0:100 en 30 minutos, usando solución A (solución mixta de acetonitrilo:cloruro de sodio 0,5 M = 10:90 que contenía ácido trifluoroacético al 0,03%) y solución B (solución mixta de acetonitrilo: cloruro de sodio 0,5 M = 50:50, que contenía ácido trifluoroacético al 0,03%). Se pesaron aproximadamente 20 mg de la muestra y se disolvieron en 10 ml de solución acuosa de cloruro de sodio al 2,9 %, de los que se ensayaron 25 µl en el método de análisis anterior.

En este caso, se usó previamente lactoperoxidasa bovina purificada (preparada por la empresa Sigma-Aldrich Co.) como patrón de referencia, para confirmar que el pico del patrón de referencia era de aproximadamente 18 minutos de tiempo de elución en el método de análisis anterior.

Seguidamente, la muestra 4 se analizó en el método de análisis anterior y la pureza de lactoperoxidasa bovina se midió mediante una integración automática relativa al área de los picos.

Como consecuencia, se confirmó que la pureza de lactoperoxidasa bovina de la muestra 4 era de 89%. Consecuentemente, se confirmó que se pudo producir lactoperoxidasa altamente purificada a partir de materiales lácteos mediante el método de la presente invención.

Aplicación industrial

La presente invención proporciona un proceso para producir lactoperoxidasa, que hace posible producir lactoperoxidasa altamente purificada con una etapa más simple, durante un período de tiempo más corto, a un coste inferior al de los procesos convencionales y que puede ser aplicado a una fabricación a escala industrial.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir lactoperoxidasa, que comprende:
- 5 - una etapa (1) para poner en contacto uno o más materiales lácteos con un intercambiador de cationes que tiene grupos débilmente ácidos como grupos de intercambio de iones para efectuar así un tratamiento de adsorción;
- una etapa (2) para lavar el intercambiador de cationes después de dicho tratamiento de adsorción;
- 10 - una etapa (3) para poner dicho intercambiador de cationes lavado en contacto con un disolvente de lixiviación que tiene una resistencia iónica de 0,07 a 0,3 y eluye lactoperoxidasa para obtener así una solución de lixiviación que tiene lactoperoxidasa eluida en dicho eluyente de lixiviación;
- una etapa (4) para concentrar dicha solución de lixiviación a través de una membrana de ultrafiltración de forma
15 que el contenido de proteínas en dicha solución de lixiviación concentrada resulta ser de 0,9 a 15%, para efectuar así la precipitación de proteínas como impurezas en la solución de lixiviación concentrada; y
- una etapa (5) para obtener una solución de lactoperoxidasa separando la precipitación de proteínas como
20 impurezas a partir de dicha solución de lixiviación concentrada.
2. Un proceso para producir lactoperoxidasa según la reivindicación 1, en el que la capacidad de adsorción de lactoferrina de dicho intercambiador de cationes es de 85 mg/10 ml o más.
3. Un proceso para producir lactoperoxidasa según la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos grupos de intercambio
25 de iones son grupos carboximetilo.
4. Un proceso para producir lactoperoxidasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el disolvente de lixiviación usado en dicha etapa (3) es una solución acuosa que contiene al menos una sal
30 seleccionada entre un grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio.
5. Un proceso para producir lactoperoxidasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende
35 adicionalmente una etapa de obtener lactoperoxidasa sólida separando el disolvente de la solución de lactoperoxidasa obtenida en dicha etapa (5).
6. Un proceso para producir lactoperoxidasa según la reivindicación 5, en el que la pureza de la lactoperoxidasa sólida es de 80% o más.