

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 001**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2004 E 04704587 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1587824**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de soluciones enzimáticas concentradas**

30 Prioridad:

31.01.2003 DE 10304066

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

06.04.2015

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen , DE**

72 Inventor/es:

**BAUR, DIETER;
PICHLER, WERNER;
RÄHSE, WILFRIED y
VAN HOLT, JENS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 001 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

Procedimiento para la purificación de soluciones enzimáticas concentradas

La presente invención se refiere a procedimientos para la purificación de soluciones enzimáticas técnicas concentradas, a los productos de procedimiento y agentes correspondientes, que se basan en tales soluciones, en particular agentes de lavado y de limpieza.

Las enzimas, en particular aquellas para campos de uso técnicos se producen hoy en día en la mayoría de los casos mediante fermentación de microorganismos, y a continuación se purifican a partir de los medios en cuestión. Las soluciones enzimáticas concentradas obtenidas a través de, en la mayoría de los casos, varias etapas de procedimiento secuenciales, se denominan a menudo también como "enzima líquida". La enzima líquida puede considerarse como materia prima purificada que, o bien se usa en forma líquida o, más raramente, se convierte en una forma seca y entonces se suministra a aplicaciones correspondientes.

Campos de uso técnicos importantes para enzimas, en particular en forma líquida, son agentes de lavado y de limpieza, que se ofrecen cada vez más también en forma líquida o forma de gel. Otros campos de uso se encuentran por ejemplo en el de la cosmética, usándose las enzimas tal como en agentes lavado y de limpieza como agentes activos, o el de la producción y el procesamiento de materiales textiles o el de la producción de alimentos, haciéndose reaccionar en primer lugar las materias primas mediante el uso de las enzimas para dar el verdadero producto.

Procedimientos de purificación o de enriquecimiento para la obtención de soluciones enzimáticas concentradas se describen en detalle en el estado de la técnica. Objetivos importantes son en este sentido la separación de la biomasa, es decir de los constituyentes en particular macromoleculares de los organismos huésped, la separación de sustancias acompañantes de bajo peso molecular e impurezas, en particular constituyentes del medio y metabolitos, y la separación de otras proteínas, en particular enzimas. Al mismo tiempo el producto de interés se obtendrá en las mayores cantidad y pureza posibles y una actividad lo más alta posible. Por otro lado los sobrenadantes de cultivo contienen en la mayoría de los casos factores, con frecuencia péptidos o proteínas, cuya identidad a menudo no se conoce aún, pero que en cambio proporcionan una estabilización de la enzima de interés. Por este motivo es especialmente ventajoso obtener una solución enzimática no completamente pura sino una que contenga un cierto porcentaje de tales sustancias acompañantes estabilizadoras.

Para el fin de la purificación se emplean en la mayoría de los casos técnicas que se basan en filtración, sedimentación o precipitación.

De este modo se han desarrollado por ejemplo para la separación de la biomasa por regla general procedimientos que han de aplicarse sucesivamente y se han establecido en el estado de la técnica. A estos pertenecen por ejemplo la separación, microfiltración y ultrafiltración. Sólo después puede hablarse en el sentido de la invención verdaderamente de un concentrado enzimático.

De este modo por ejemplo de la solicitud WO 01/37628 A2 se desprende un procedimiento para la obtención de sustancias de valor producidas biotecnológicamente a partir de soluciones de cultivo y/o de fermentador, que comprende la separación de los sólidos insolubles en agua de la solución acuosa, que contiene las sustancias de valor, posterior filtración de la solución obtenida y concentración de la solución que contiene sustancias de valor por medio de ultrafiltración. Se caracteriza porque los sólidos separados se someten a una etapa de lavado, usándose como líquido de lavado el filtrado de la etapa de concentración.

Además queda por resolver sin embargo el problema de que los concentrados enzimáticos separados de la biomasa contienen en particular las siguientes sustancias acompañantes:

1. sólidos en particular precipitaciones de proteínas desnaturalizadas de forma irreversible, también de la proteína de interés,
2. compuestos de color, en la mayoría de los casos de color marrón, que se han generado durante la esterilización previa a la fermentación de los constituyentes del medio, especialmente de las fuentes de nitrógeno (compuestos de Maillard), y
3. factores, que aumentan la estabilidad de la proteína de interés.

Los métodos de purificación convencionales son adecuados sólo en medida insuficiente para eliminar a partir de un concentrado enzimático separado de la biomasa proteínas desnaturalizadas y compuestos de color; o eliminan junto con éstos también una gran parte de los factores estabilizadores. La consecuencia de esto es en cualquier caso una calidad de producto no satisfactoria: o bien el concentrado enzimático presenta un color oscuro, estrías y/o partículas en suspensión hasta sustancias precipitadas, o bien, en el caso de un color claro y una solución clara dispone de una estabilidad enzimática insuficiente; esto último puede compensarse en la mayoría de los casos sólo en cierta medida mediante la adición de compuestos estabilizadores (caros). Estas desventajas repercuten en particular en los productos en los que se incorpora el concentrado en cuestión.

Por ejemplo los agentes de lavado o de limpieza líquidos deberán contener a lo largo del tiempo del almacenamiento

un porcentaje lo más alto posible de enzima activa, es decir estable. A este respecto se comportan sin embargo el contenido en agua y la estabilidad de manera proporcionalmente inversa entre sí. Al mismo tiempo estos agentes tendrán un color agradable para el usuario y un aspecto claro.

5 En el estado de la técnica se describen procedimientos para la decoloración de soluciones enzimáticas concentradas. A estos pertenecen métodos de precipitación, por ejemplo con disolventes orgánicos o polímeros, en particular también la precipitación por sales de la proteína de interés con sulfato de sodio (se describe en H.Ruttloff (1994): "Industrielle Enzyme" Behr's Verlag, Hamburgo, capítulo 6.3.3.6, páginas 376 a 379). De este modo, por ejemplo por la patente estadounidense US 5405767 se desprenden determinados compuestos que deben añadirse a la solución de proteína que va a precipitarse para obtener precipitados ventajosos. En este sentido se precipita la proteína, permaneciendo en el sobrenadante las sustancias acompañantes. No obstante mediante la precipitación y resuspensión se desnaturaliza una parte de la proteína de forma irreversible y se perjudica en conjunto la estabilidad; no menos importante también se separan compuestos que deben estabilizarse. Como rendimientos que deben alcanzarse se indican en la Tabla en la página 378 del libro de texto mencionado aproximadamente el 50 %.

15 Una alternativa adicional consiste en la purificación por adsorción de las enzimas, por ejemplo a través de una resina de intercambio iónico (H.Ruttloff (1994): "Industrielle Enzyme" Behr's Verlag, Hamburgo, capítulos 6.3.3.7 y 6.3.3.8, páginas 379 a 396). En este sentido las proteínas de interés se unen a un material de cromatografía y se eluyen a continuación con otro medio. No obstante, de este modo, debido a los efectos de la desnaturalización y del plegamiento, se consiguen así mismo en la mayoría de los casos sólo malos rendimientos. De este modo para distintos procedimientos de cromatografía (aparte de la cromatografía de afinidad) en la tabla de la página 378 se indican valores de rendimiento de como máximo aproximadamente el 60 %. Los materiales específicos, en particular los materiales de cromatografía de afinidad son en general conductores, pero también muy sensibles y costosos de producir. Por lo tanto, estos últimos no encuentran sin embargo prácticamente ninguna aplicación principalmente en la analítica y la tecnología médica, en la producción de enzimas a gran escala.

25 De este modo, por ejemplo la solicitud de patente WO 89/05863 A1 describe la obtención de enzimas extracelulares a partir del caldo de fermentación de cepas de Bacillus. En este documento se describen experimentos para la eliminación de polímeros de la pared celular a través de una cromatografía de intercambio iónico, en particular en el transcurso de una preparación de amilasa. A este respecto se aplica en primer lugar la solución que contiene enzima y polímero sobre la columna, entonces en primer lugar se lava con tampón y a continuación se eluye con un medio de elución. Es decir la alfa-amilasa que va a purificarse se une en primer lugar al igual que las sustancias acompañantes al material de cromatografía y solo se separa por lavado a continuación aumentando la fuerza iónica.

30 El planteamiento inverso, dirigido a agotar las impurezas a través de un material de soporte a partir de la solución líquida, se ha seleccionado hasta el momento sólo para materias primas alimenticias. De este modo la patente US 5972121 da a conocer la eliminación de colorantes a partir de soluciones de azúcar a través de una cromatografía de adsorción débilmente ácida o una cromatografía de adsorción débilmente básica. También en el manual "DIAION®. Manual of ion exchange resins and synthetic adsorbent, volumen II" de la empresa Mitsubishi Kasei Corp. (Tokyo, Japón), 2 edición, 1.5.1993, se describe en las páginas 93 a 100 la decoloración de azúcares, entre otros, a través de etapas de cromatografía de intercambio iónico distintas, sucesivas. Mediante este planteamiento inverso resultan en principio varias etapas de purificación en detalle en cada caso muy selectivas, en las que la impureza en cada caso separable permanece sobre el material correspondiente.

40 En la patente US 5565348, que trata de la obtención de una proteasa alcalina determinada de un Bacillus, se describe en un ejemplo la purificación de esta enzima a través de un proceso de purificación que consiste en numerosas etapas. A éstas pertenecen en particular las etapas de la precipitación de la proteína mediante precipitación por sales, la absorción en otro medio y una diálisis, antes de que se lleve a cabo una cromatografía de intercambio iónico; a ésta le sigue a su vez una cromatografía de afinidad, es decir una etapa de cromatografía en la que la proteasa se une específicamente al material de la columna. Con respecto a la etapa de cromatografía de intercambio iónico, es decir, la proteasa especial descrita no se une al material de cromatografía especial usado, y se obtendrá por lo tanto con la descarga. Sin embargo esto no parece una enseñanza generalizable para la purificación de la enzima, porque no se da ningún dato sobre el material de columna en cuestión, no se indica la concentración de la enzima y la verdadera purificación de sustancias acompañantes ya ha tenido lugar en la precipitación anterior, o se garantiza mediante la siguiente cromatografía de afinidad. Purificar una enzima, en particular una proteasa a través de un material de columna, al que no se ha unido en absoluto, no se había considerado por lo tanto hasta el momento en el estado de la técnica, sobre todo no prescindiendo de una etapa de precipitación.

55 Se planteó por lo tanto el objetivo de liberar concentrados enzimáticos de sólidos, en particular de proteínas desnaturalizadas de forma irreversible, y decolorarlas de manera controlada, de modo que al mismo tiempo se mantenga una estabilidad en almacenamiento lo más alta posible de los concentrados.

Este objetivo se consigue mediante procedimientos para la purificación de soluciones enzimáticas concentradas de acuerdo con la reivindicación 1.

En este sentido no tiene lugar ninguna precipitación. Más bien las proteínas enzimáticas de interés permanecen en

solución a lo largo de todo el procedimiento, mediante lo cual tal como se expone en adelante y en los ejemplos, son especialmente ventajosos determinados intervalos de concentración con respecto a los rendimientos que van a alcanzarse.

5 La etapa de procedimiento (a) precede a procedimientos conocidos, descritos en el estado de la técnica para la preparación de soluciones enzimáticas acuosas, enriquecidas, principalmente libres de biomasa. Por regla general se trata a este respecto de varias etapas parciales, tal como ruptura celular, peletización de los residuos celulares, decantación y opcionalmente etapas de centrifugación adicionales. También pueden usarse separación, microfiltraciones, ultrafiltraciones o filtraciones estériles (véase más adelante) y la concentración, es decir la eliminación de disolvente hasta un intervalo de concentración medio de la enzima. Puede considerarse óptimo a este respecto un valor de concentración enzimática que se encuentra en el intervalo de magnitudes de la mitad de intervalo denominado concentración de trabajo óptima en el procedimiento adicional (véase más adelante). Es ventajoso así mismo un porcentaje de materia en suspensión o de sólidos que debe alcanzarse inferior al 1 % en volumen, tal como puede comprobarse por ejemplo a través de centrifugación con una centrifuga de sobremesa durante 10 minutos a 7000 g. La solución en cuestión se ajustará además a un valor de pH que es compatible para la enzima y al que presenta una carga positiva.

10 También la etapa (a), que se denomina en la Figura 1 como "concentración", se basa en métodos, que son en sí conocidos para el experto. Para la concentración pueden usarse por ejemplo un rotavapor o un evaporador de capa fina. Es especialmente ventajoso a este respecto cuando el valor de pH tal como se ajustó previamente permanece principalmente constante y que el porcentaje de sólidos del concentrado enzimático permanezca lo más bajo posible (véase más adelante). De lo contrario las pérdidas en la siguiente etapa (b) aumentan fuertemente de manera desventajosa.

15 La etapa (a) se controlará a través de los métodos conocidos (en particular mediante interrupción a tiempo de la concentración) de modo que el concentrado enzimático obtenido no presenta precisamente ninguna precipitación de proteína (cuantitativa). El intervalo de trabajo óptimo debe determinarse individualmente a este respecto para cada enzima, en concreto no sólo con respecto a la temperatura, el valor de pH y la fuerza iónica, sino en particular con respecto a un intervalo de concentración enzimática óptimo. Esto se ha efectuado los Ejemplos 1 y 2 de la presente solicitud para la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* y para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). Para la proteasa sometida a ensayo se determinó entonces un intervalo de concentración óptimo de 700.000 a 800.000 HPE/g y para la α -amilasa uno de 35.000 a 45.000 TAU/g. Por encima de estos valores aumenta el porcentaje de sólidos precipitados en función de la actividad rápidamente de manera sobre-proporcionada, lo que va acompañado de una pérdida que crece drásticamente de producto objetivo. Estos efectos se ilustran para las enzimas de ejemplo mencionadas mediante la Figura 2. Una dependencia de este tipo del porcentaje de sólidos de la concentración de proteína, en particular en la actividad enzimática, puede esperarse prácticamente para todas las enzimas técnicas. Debe determinarse en el caso particular experimentalmente y el procedimiento orientarse sobre los procedimientos de concentración en sí conocidos y opcionalmente procedimientos de dilución.

20 Tal como se muestra así mismo en los ejemplos, se prefiere mantener en la medida de lo posible este intervalo de trabajo a lo largo de todo el procedimiento, para trabajar por un lado de manera altamente concentrada y por lo tanto eficiente pero, por otro lado, para perder la menor cantidad posible de enzima por desnaturalización y precipitación. De esta manera pudieron conseguirse rendimientos de hasta el 95 % para todo el procedimiento.

25 De manera opcional a la etapa (a) le sigue la desodorización (a') indicada en la Figura 1. Esto se trata más adelante.

30 La separación de las precipitaciones generadas mediante la concentración (sólidos) de acuerdo con la etapa (b) se refiere en particular a proteínas extrañas y/o enzimas inactivas especialmente en las proximidades del producto de solubilidad. Esta etapa se denomina en el diagrama de flujo de bloques de la Figura 1 como "separación". Tienen lugar así mismo de acuerdo con métodos en sí conocidos por ejemplo a través de un separador (véase más adelante), tal como se da a conocer también en los ejemplos con respecto a la presente solicitud.

35 En el sobrenadante que contiene la enzima de interés deberá estar contenida la menor cantidad posible (véase más adelante) de materias en suspensión, es decir de sólidos, que puede determinarse a través de una centrifuga de sobremesa tal como se indicó anteriormente. Entonces las proteínas precipitadas como sólidos no pueden llevarse a solución de nuevo mediante dilución sin pérdida considerable (véase más adelante) y sólo con una drástica reducción de la concentración. Además perjudican, tal como también otros sólidos, la siguiente etapa de cromatografía, pudiendo bloquear la columna.

40 La etapa (c), con la decoloración del sobrenadante principalmente libre de sólidos, de la etapa (b), a través de un intercambiador aniónico fuertemente básico (adsorbedor), representa el núcleo de la invención. En esta etapa se adsorben sobre todo las sustancias acompañantes coloreadas a la resina, en particular los compuestos de Maillard, mientras que mediante la carga fuertemente positiva del intercambiador las proteínas cargadas así mismo positivamente en las condiciones que van a seleccionarse correspondientemente, no se unen a la resina, sino que se mantienen con el eluato en una solución principalmente clara. La etapa (c) representa por lo tanto una separación selectiva de los colorantes a partir de la solución enzimática concentrada.

La ventaja de este procedimiento con respecto a los procedimientos descritos en el estado de la técnica consiste en que las sustancias de valor de interés, es decir, las proteínas enzimáticas permanecen en solución, es decir no tienen que desnaturalizarse y renaturalizarse, y por lo tanto no varía su estructura espacial. Permanecen por lo tanto también en la fase que va a procesarse adicionalmente y no se descargan del sistema. De esta manera pudieron 5 conseguirse los altos rendimientos mencionados anteriormente.

Las sustancias coloreadas principalmente, unidas a la resina, tal como está indicado en la Figura 1 mediante flechas gruesas correspondientes, se eluirán a continuación, es decir después de la salida de la fase que contiene la sustancia de valor (del producto objetivo) y opcionalmente una fracción de cola en una etapa separada. Esto se produce por ejemplo con soluciones con alta fuerza iónica, por ejemplo soluciones de NaCl concentradas. A través 10 de contra-iones correspondientes, por ejemplo NaOH puede regenerarse el material intercambiador aniónico. En función del material de cromatografía pueden ser más adecuadas otras sales simples. Que este material pueda tratarse con compuestos de este tipo, y además económicos, lleva además del efecto de purificación a una esterilización. El sistema es por lo tanto capaz de "CIP" (de "cleaning in place").

La enzima líquida después de la etapa de procedimiento (c) está principalmente libre de estrías, precipitaciones y colorantes. También con un almacenamiento más largo a distintas temperaturas permanece claro, transparente y blanco y presenta al mismo tiempo una alta cantidad de estabilidad. Ejemplos de valores de color alcanzables de acuerdo con la escala de color CIE usada internacionalmente (definida en la norma DIN 5033-3 y DIN 6174) se desprenden de los ensayos descritos en los ejemplos de la presente solicitud. 15

De manera opcional a la etapa de procedimiento (c) le sigue la etapa (d) descrita más detalladamente más adelante según la cual el producto de cromatografía altamente concentrado se mezcla con disolventes. Esto lo ilustra también la Figura 1 ("mezcla"). 20

Esta solución enzimática concentrada purificada, obtenida de acuerdo con la etapa (c) o (d), está agotada claramente en particular con respecto a las impurezas coloreadas, sin embargo contiene aún prácticamente sustancias acompañantes incoloras, que debido a su efecto en parte estabilizador son especialmente bienvenidas y no necesitan/deben separarse de la solución enzimática concentrada. Etapas intermedias adicionales pueden anticiparse, incorporarse, realizarse posteriormente o llevarse a cabo junto con las etapas mencionadas según el problema de separación. Ejemplos de tres etapas intermedias opcionales de este tipo se exponen más adelante. 25

Una posibilidad adicional consiste por ejemplo en separar de manera controlada sustancias acompañantes adicionales a partir de la solución enzimática concentrada, mediante una o varias etapas de cromatografía adicionales en particular a través de otros materiales de soporte, que se describen suficientemente en el estado de la técnica (véase más adelante). Éstas pueden tener lugar en cualquier instante del procedimiento que parezca útil para el caso individual, de manera ventajosa inmediatamente antes o después de la etapa de cromatografía descrita en (c), opcionalmente separadas entre sí por etapas intermedias tal como filtraciones o resolubilizaciones. 30

Un cambio de disolvente, que puede efectuarse en distintos puntos del procedimiento de acuerdo con la invención, preferentemente antes de o en lugar de la etapa (d), se desprende por ejemplo de la solicitud DE 19953870 A1. Esta da a conocer un procedimiento para la elaboración de una preparación enzimática pobre en agua, que contiene un disolvente orgánico, en el que se mezcla una preparación enzimática acuosa con un disolvente orgánico con un punto de ebullición de más de 100 °C, y a continuación se separa por destilación el agua. 35

La enzima líquida obtenida de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención puede usarse o procesarse adicionalmente de manera en sí conocida. Se le atribuye especial importancia como materia prima para la incorporación en agentes de lavado o de limpieza, en particular en forma líquida. El equilibrio requerido de acuerdo con la invención entre el color claro de un producto de este tipo y la estabilidad más que satisfactoria lo ilustra el Ejemplo 3, cuyo resultado también está representado en la Figura 3. En ella se reconoce que el producto purificado de esta manera sólo es ligeramente más inestable que la enzima no purificada, pero sin embargo es casi incoloro, y 40 que por otra parte, sigue siendo mucho más estable que un producto comercial, que se ha decolorado de manera convencional, concretamente con precipitación.

A continuación se exponen formas de realización preferidas y objetos de la invención adicionales. 45

Tal como se mencionó anteriormente en la etapa de procedimiento (a) de acuerdo con procedimientos conocidos, descritos en el estado de la técnica, se introducen concentrados enzimáticos libres de la biomasa, acuosos enriquecidos. Por regla general para ello son necesarias varias etapas parciales. Procedimientos de acuerdo con la invención preferidos se caracterizan porque como última etapa inmediatamente anterior a la etapa de procedimiento (a) se lleva a cabo una ultrafiltración, de modo que en la etapa de acuerdo con la invención (a) se introduce un concentrado de ultrafiltración. Un procedimiento de este tipo se describe por ejemplo en el documento WO 01/37628 A2. De esta manera se obtienen soluciones enzimáticas comparativamente puras, enriquecidas ya hasta un valor de concentración medio con un bajo contenido en sólidos (véase Ejemplo 1). 50 55

Tal como se mencionó para la concentración de acuerdo con la etapa (a) se usan métodos en sí conocidos tal como por ejemplo aquellos con ayuda de un rotavapor o de un evaporador de capa fina; se prefiere la última forma de realización.

En una forma de realización preferida adicional la etapa (a) se lleva a cabo a través de los parámetros que van a ajustarse en cada caso, en particular la duración del proceso de concentración u opcionalmente dilución, de modo que se obtiene un concentrado enzimático, que no contiene más del 4 al 20 % en peso, preferentemente no más del 4,5 al 15 % en peso, y de manera especialmente preferente no más del 5 al 10 % en peso de sustancia seca.

- 5 En el caso de la sustancia seca se trata, a diferencia de los sólidos descritos anteriormente, indeseados, del contenido total de la solución enzimática concentrada en sustancias sólidas, tal como se obtendrían por ejemplo mediante evaporación completa de la solución. Estos valores pueden determinarse de acuerdo con métodos en sí conocidos por ejemplo mediante secado de un alícuota o mediante medición de absorción y comparación con una curva de calibración. Los valores indicados han resultado ser valores especialmente adecuados en el procesamiento adicional. Entonces, por un lado la solución, para evitar pérdidas, debería ser lo más concentrada posible, por otro lado una viscosidad demasiado alta llevaría a dificultades en el rendimiento constante.

- 15 En una forma de realización preferida adicional los procedimientos de acuerdo con la invención se caracterizan porque a continuación de la etapa (a) con etapas (a') se lleva a cabo una desodorización de la solución enzimática concentrada. Métodos de desodorización de este tipo, integrables en un proceso continuo, se conocen por el estado de la técnica. Éstos se prefieren entonces especialmente cuando en el caso de los microorganismos usados para la producción de la proteína enzimática se trata de aquellos que forman sustancias acompañantes de olor desagradable o que depositan proteínas que descomponen muy rápidamente otros constituyentes.

- 20 También la etapa de procedimiento (b) que sigue a (a), o la desodorización (a'), la separación de sólidos, se basa en métodos en sí conocidos, por ejemplo filtración. Entre ellos se prefieren sin embargo procedimientos de separación mecánicos, preferentemente basados en la separación por la fuerza de la gravedad o la fuerza centrífuga.

A estos pertenecen en particular separadores preferentemente separadores que trabajan de manera continua, que pueden integrarse en una realización de proceso continuo. Entre ellos se prefieren especialmente aquellos con una descarga de sedimento discontinua. Estos se dan a conocer también por los ejemplos con respecto a la presente solicitud.

- 25 El sentido de la etapa (b) consiste en reducir el contenido del concentrado enzimático en materias en suspensión o sólidos hasta un valor lo más bajo posible. Procedimientos preferidos se caracterizan porque en la solución enzimática concentrada mediante la etapa (b) no se obtiene más del 1 % en volumen, preferentemente no más del 0,7% en volumen, de manera especialmente preferente no más del 0,5 % en volumen de sólido. Esto puede regularse a través del control en sí conocido de los aparatos en cuestión; en particular los separadores mencionados proporcionan soluciones correspondientemente ventajosas.

- 35 El núcleo del procedimiento de acuerdo con la invención representa con la etapa (c) la cromatografía de intercambio aniónico fuertemente básica. El éxito del procedimiento depende por lo tanto de manera decisiva del tipo del material de cromatografía seleccionado y de la realización del ensayo, por ejemplo, la descarga de muestra. Tal como ya se expuso, en este sentido sobre todo las sustancias acompañantes coloreadas se adsorberán sobre el material, mientras que las proteínas cargadas positivamente en las condiciones que van a seleccionarse correspondientemente, no se unen precisamente sobre la resina. Por lo tanto la invención se basa en un intercambiador aniónico fuertemente básico. Debido al hecho de que las proteínas en la mayoría de los casos naturales solubles en agua, en particular secretadas, son solubles en agua más bien a valores de pH medios, es especialmente ventajoso cuando el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) en el intervalo de pH de 5 a 9, preferentemente de 6 a 8 presenta capacidad de intercambio máxima.

- 40 En particular proteínas alcalinas, tal como por ejemplo las enzimas secretadas por microorganismos alcalófilos, en particular proteasas, presentan un punto isoelectrico que se encuentra en el intervalo alcalino, por lo tanto están cargadas positivamente en el intervalo de pH preferido, y por lo tanto no se unen al material en cuestión. Tal como se mencionó, para cada proteína debe determinarse experimentalmente un valor de pH ideal para este procedimiento y ajustarse con respecto a esta etapa (c). En los Ejemplos 1 y 2 estos valores para la proteasa alcalina seleccionada y la α -amilasa seleccionada se encontraban en aproximadamente 7,5 y 7.

- 45 Han resultado ser especialmente adecuados para la etapa (c), debido a sus propiedades químicas, intercambiadores aniónicos fuertemente básicos, que como grupos funcionales presentan grupos amonio cuaternario, preferentemente aquellos que están sustituidos con al menos dos grupos alquilo, de manera especialmente preferente con al menos dos grupos alquilo con 1 o 2 átomos de carbono, y de manera opcional adicionalmente un grupo hidroxilo que presenta 1 o 2 átomos de carbono.

- 50 Este requisito se satisface en particular mediante intercambiadores aniónicos fuertemente básicos con los grupos funcionales trimetil-amonio o dimetiletanol-amonio. Este último es un tanto más débilmente básico que el mencionado en primer lugar de modo que en particular mediante esta variación puede optimizarse con respecto a proteínas correspondientes.

55 Materiales de cromatografía correspondientes caracterizan por consiguiente formas de realización preferidas.

Un rasgo característico adicional para materiales de cromatografía es su capacidad de intercambio que se indica en moles equivalentes por unidad de volumen. Esta indica la densidad con la que el material está ocupado con grupos funcionales. Han resultado ser especialmente adecuados aquellos procedimientos que se caracterizan porque el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) presenta una capacidad de intercambio de 0,7 a 1,2 meq/ml, preferentemente de 0,8 a 1,1 meq/ml, y de manera especialmente preferente de 0,9 a 1,0 meq/ml.

Un criterio adicional que influye en la capacidad de separación de la columna de cromatografía es el tamaño de poro efectivo. Este debe orientarse a que resulte una retención suficiente pero al mismo las sustancias separadas por lavado, en particular las proteínas no se mantengan con demasiada intensidad o incluso bloqueen el material. Para las dos proteínas globulares sometidas a ensayo en los ejemplos indicados, proteasa alcalina de *B. lentus* y α -amilasa de *Bacillus sp.* a 7-7 (DSM 12368), cuyo peso molecular se encuentra en aproximadamente 27 kDa, o aproximadamente 58 kDa, ha resultado ser útil un material de cromatografía cuyo tamaño de poro efectivo se encuentra en 0,45 μ m. Para proteínas claramente más grandes o más pequeñas se seleccionarán materiales de cromatografía con tamaños de poro efectivos correspondiente más grandes o más pequeños.

Procedimientos preferidos se caracterizan por lo tanto porque el intercambiador aniónico fuertemente básico presenta tamaños de poro efectivos de 0,2 a 0,7 μ m, preferentemente de 0,3 a 0,6 μ m, de manera especialmente preferente de 0,4 a 0,5 μ m.

En principio son adecuados como soporte para intercambiadores aniónicos fuertemente básicos que van a usarse de acuerdo con la invención, todos los materiales descritos para ello en el estado de la técnica, por ejemplo también soportes en forma de gel. Por el contrario debido a sus características técnicas, tales intercambiadores aniónicos fuertemente básicos se prefieren para la etapa (c), que se basan en un polímero de plástico poroso. Han resultado ser especialmente ventajosos aquellos a base de un copolímero de estireno-DVB.

Los materiales de cromatografía que presentan las propiedades discutidas en este momento, se describen en detalle en el estado de la técnica. Aquellos de las series DIAION® se describen por ejemplo en el manual "DIAION®. Manual of ion exchange resins and synthetic adsorbent, volumen I" de la empresa Mitsubishi Kasei Corp. (Tokyo, Japón), junio de 1995, en las páginas 104 a 108 y en "Product Line Brochure DIAION®", Stand 1.6.2001, en las páginas 4 a 6, que puede obtenerse por el fabricante, o Summit Chemicals Europe GmbH, Düsseldorf, Alemania. Como intercambiadores aniónicos fuertemente básicos se describen en los mismos las series DIAION®SA, DIAION®PA y DIAION®HPA. Un representante de los mismos en concreto DIAION®PA308L se usó con éxito en los ejemplos de la presente solicitud.

Materiales químicamente similares que pueden usarse para la cromatografía de acuerdo con la etapa (c) pueden producirse correspondientemente a los datos mencionados anteriormente con respecto a las propiedades preferidas por expertos correspondientes, o también pueden obtenerse de otros fabricantes comerciales, y caracterizan así mismo formas de realización preferidas. Resultados comparables se obtienen por ejemplo con los materiales DOW MSA MARATHON® de la empresa Dow Chemicals y Amberlite®900CL de la empresa Rohm & Haas.

Mediante la realización de la cromatografía en la etapa (c) se mantienen condiciones determinadas de manera ventajosa. A éstas pertenece en particular un cierto volumen de lecho tratándose de la relación de volumen de la sustancia aplicada con respecto al de la columna, y un cierto tiempo de permanencia, que se indica favorablemente a través de la solución enzimática.

Ha resultado ser especialmente ventajoso y caracteriza formas de realización preferidas correspondientemente, la etapa (c) con un volumen de lecho de 1 a 10, preferentemente de 1,5 a 7, de manera especialmente preferente de 2 a 4. En este sentido se trata del valor óptimo determinado experimentalmente de acuerdo con los ejemplos, para mantener al filtrado lo más puro posible y al mismo tiempo lo más concentrado posible.

Como tiempos de permanencia promedio en la etapa (c) adecuados y que caracterizan formas de realización preferidas correspondientemente se determinaron a este respecto valores de 0,01 a 0,2 g, preferentemente de 0,025 a 0,1 g, de manera especialmente preferente de 0,04 a 0,06 g y de manera muy especialmente preferente de 0,05 g de enzima por g de material de soporte y minuto.

Procedimientos especialmente adecuados se caracterizan porque están controlados de manera principalmente automática. Una posibilidad de control tal especialmente fácil de incorporar se basa en que la conductividad (medible como μ S/cm), de un material procesado, se controla en puntos críticos y se usa para el control. Esto es posible, por ejemplo, después de la cromatografía, y puede usarse para separar las fracciones que contienen sustancia de valor (producto objetivo) del resto. En una forma de realización preferida, un procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la etapa (c), en particular la separación entre fracción de cabeza y producto objetivo y/o producto objetivo y fracción de cola se controla a través de la conductividad del eluato.

Para aumentar el rendimiento se ha propuesto ya en la solicitud WO 01/37628 A2, usar el filtrado para una etapa de lavado adicional. Por consiguiente también procedimientos de acuerdo con la presente invención se caracterizan preferentemente porque la etapa (c) tiene lugar con recirculación de al menos una parte de la fracción de cabeza y/o de la fracción de cola de la cromatografía de intercambio iónico. Con ello se consigue un enriquecimiento adicional de la fracción en cuestión con tales moléculas enzimáticas, que hacia el final del pico no se han separado por lavado

aún de la columna. Esta etapa se limita en principio por las posibles impurezas, que se separan por lavado posiblemente de la columna. En el caso individual ha de ponderarse entre la concentración alcanzable y la calidad del producto, es decir la pureza.

5 Durante el proceso descrito hasta el momento, se ha trabajado por motivos de eficiencia con una concentración enzimática lo más alta posible. Por el contrario, las soluciones enzimáticas concentradas para su fin técnico, no se necesitan con frecuencia en concentraciones elevadas de este tipo. De manera correspondiente procedimientos de acuerdo con la invención preferidos por lo tanto se caracterizan porque a continuación de la etapa (c) en una etapa (d) mediante dilución se ajusta un valor de concentración más bajo. Para ello se usan mezcladoras conocidas por el estado de la técnica, en particular integrables en un sistema continuo.

10 Por otro lado todas las enzimas líquidas tienden, durante el almacenamiento, a desnaturalizarse y por lo tanto a perder su actividad. Esto se produce en particular en las proteasas, que hidrolizan otras moléculas enzimáticas. Un procedimiento de acuerdo con la invención preferido se caracteriza por lo tanto porque a continuación de la etapa (c) se añade un estabilizador o una mezcla de estabilizadores. Tales compuestos son en sí conocidos por el estado de la técnica. Se trata por ejemplo de aquellos que actúan de manera estabilizadora a través de la regulación de la actividad de agua de manera biofísica por ejemplo con respecto a oscilaciones de temperatura, tales como polioles, de aquellos que inactivan de manera reversible las proteasas o que representan la protección contra la oxidación.

La adición del estabilizador o de la mezcla de estabilizadores puede tener lugar opcionalmente antes, después o al mismo tiempo que una dilución (d). Es especialmente ventajoso cuando justo se usa esta etapa (d), para añadir junto con la solución de dilución una solución de estabilizador o una solución que ejerza ambos efectos.

20 Preferentemente se trata en el caso del estabilizador añadido de compuestos líquidos con grupos hidroxilo, por ejemplo un poliol tal como glicerol o de manera especialmente preferente de 1,2-propanodiol. Así mismo en el caso de compuestos líquidos de este tipo puede tratarse de mezclas con agua y/u otros compuestos estabilizadores adicionales.

25 Ha resultado especialmente favorable para desplegar el efecto de estabilización, cuando la mezcla de estabilizadores de poliol se añade en un intervalo de cantidades del 40 al 70 % en volumen, preferentemente del 45 al 65 % en volumen, de manera especialmente preferente del 50 al 60 % en volumen del volumen final.

30 De manera opcional en este punto, cuando mediante la dilución resultara una solución débilmente concentrada, entre las etapas (c) y (d), puede conectarse una etapa de concentración, antes de que la solución se conduzca a través de la mezcladora. En principio pueden aplicarse para ello todos los métodos conocidos por el estado de la técnica, preferentemente los métodos descritos anteriormente.

Esto es también un argumento adicional para trabajar, durante el procedimiento hasta el momento, con una solución enzimática lo más concentrada posible, para mediante este efecto de dilución drástico, obtener una enzima líquida, que esté aún suficientemente concentrada para el campo de uso técnico proyectado.

35 Esta etapa es de dilución puede usarse así mismo para ajustar el producto de procedimiento a un contenido en sustancia seca del 1 al 15 % en peso, preferentemente del 5 al 13 % en peso, de manera especialmente preferente del 8 al 12 % en peso. Así mismo puede servir para ajustar el producto final de procedimiento a un valor de viscosidad de 1 a 20 mPas, preferentemente de 1 a 15 mPas, de manera especialmente preferente de 1 a 10 mPas a 25 °C y/o para ajustar el producto de procedimiento a un porcentaje de sedimento inferior al 1 % en volumen, preferentemente inferior al 0,75 % en volumen, de manera especialmente preferente inferior al 0,5 % en volumen.

40 Estos valores están correlacionados por regla general entre sí, y han resultado ser especialmente adecuados para el almacenamiento y/o manipulación adicional de enzimas líquidas. Este ajuste ha de tenerse en cuenta, tal como se expuso anteriormente, a continuación de la cromatografía, o antes de la adición de un estabilizador. Los procedimientos de acuerdo con la invención, que cumplen estos requisitos, se prefieren de manera correspondiente.

45 De acuerdo con la invención se habla de enzimas, cuyas soluciones concentradas se purifican de acuerdo con procedimientos de acuerdo con la invención. Las enzimas representan formas de realización preferidas, porque, por un lado son de especial interés técnico, y por otro lado pueden detectarse a través de sus actividades específicas, lo que puede aprovecharse en particular para la determinación del intervalo de trabajo óptimo de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2 y la Figura 2. No obstante este procedimiento puede aplicarse en todas las proteínas solubles en agua, siempre que para éstas se encuentren sistemas de disolvente correspondientes y materiales de cromatografía correspondientes y puedan establecerse reacciones de detección correspondientes. Por ejemplo esto es válido para péptidos, por ejemplo hormonas peptídicas, oligopéptidos con importancia farmacológica o para anticuerpos. Los anticuerpos se tenían en cuenta por ejemplo también para la detección. Todas estas proteínas se entenderán en el sentido de la presente invención como enzimas.

55 En el centro de interés se encuentran sin embargo enzimas que pueden usarse técnicamente en el sentido convencional. A este respecto se trata preferentemente de una hidrolasa o una oxidorreductasa, de manera especialmente preferente de una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa o de una peroxidasa. Procedimientos de acuerdo con la invención que están concebidos en particular a través de la determinación y el establecimiento de condiciones de proceso adecuadas (véase anteriormente) para el procesamiento de tales

soluciones enzimáticas, representan de manera correspondiente formas de realización preferidas de la presente invención.

5 Son de un interés especialmente grande, en particular para la producción de agentes de lavado y de limpieza las proteasas, preferentemente proteasas alcalinas, porque éstas son especialmente activas y pueden incorporarse en formulaciones alcalinas. De manera correspondiente procedimientos preferidos son, por lo tanto, aquellos que se caracterizan por proteasas correspondientes.

Entre ellos se prefieren, debido a las propiedades bioquímicas de las proteasas alcalinas mencionadas aquellos procedimientos que se caracterizan porque en particular la etapa (c) se lleva a cabo a un valor pH de 5 a 9, preferentemente de 6 a 8,5, de manera especialmente preferente de 7 a 8.

10 Una proteasa de este tipo se ha sometido a ensayo también en los Ejemplos 1 y 3. En ellos se ha mostrado, que para la realización de un proceso de acuerdo con la invención es necesario mantener un valor de actividad crítico, para mantener lo más baja posible la cantidad de sólidos que se producen. De manera correspondiente procedimientos preferidos para la purificación de las soluciones de proteasa concentradas mencionadas se caracterizan por lo tanto porque el producto de la etapa (a) se ajusta a un valor de actividad de 600.000 a 900.000, preferentemente de 650.000 a 850.000, de manera especialmente preferente de 700.000 a 800.000 HPE por g. Para esta regulación, es decir, concentración u opcionalmente dilución, son adecuados los parámetros conocidos por el estado de la técnica de las etapas parciales expuestas anteriormente.

20 De manera correspondiente a lo anteriormente dicho los productos finales previstos para el uso adicional, presentan ventajosamente valores de actividad bajos, tal como pueden ajustarse en particular mediante dilución con soluciones estabilizadoras. Con respecto a las proteasas tales procedimientos representarán formas de realización preferidas, de acuerdo con los cuales el producto final se ajusta a un valor de actividad de 150.000 a 500.000, preferentemente de 175.000 a 300.000, de manera especialmente preferente de 200.000 a 260.000 HPE por g.

25 Un tipo de enzima de importancia técnica adicional son las α -amilasas. Estas se usan por ejemplo en la industria alimentaria para la producción de productos de panificación y panadería, o debido a su actividad hidrolizadora de almidón se añaden a agentes de lavado y de limpieza. De manera correspondiente a lo mencionado para las proteasas son especialmente preferidas las α -amilasas alcalinas. En el caso de procedimientos preferidos correspondientemente se trata por consiguiente de aquellos que están concebidos para el tratamiento de α -amilasas y se caracterizan por las mismas; preferentemente para o mediante aquellos con un valor óptimo de pH alcalino.

30 Tal como se expone en el Ejemplo 2 y 3, procedimientos de acuerdo con la invención preferidos para el procesamiento de α -amilasas se caracterizan porque el producto de la etapa (a) se ajusta a un valor de actividad de 30.000 a 50.000 TAU por g, preferentemente de 35.000 a 45.000 TAU por g.

35 Dado que también las α -amilasas en la mayoría de los casos se usan en concentraciones correspondientemente bajas, y además se estabilizarán así mismo, procedimientos de acuerdo con la invención así mismo preferidos se caracterizan porque el producto final se ajusta a un valor de actividad de 4.000 a 14.000, preferentemente de 6.000 a 12.000, de manera especialmente preferente de 8.000 a 10.000 TAU por g.

40 En un tipo de enzima técnica especialmente importante adicionalmente se trata de celulasas, que por ejemplo se usan en la industria de los agentes de lavado y en la producción de materiales textiles para el tratamiento superficial de materiales textiles. Por lo tanto representan también procedimientos que se caracterizan por una celulasa, preferentemente con un valor óptimo de pH alcalino, de manera correspondiente formas de realizaciones preferidas de la presente invención.

45 Todos los parámetros de procedimiento expuestos hasta el momento se reflejan en los productos de procedimiento respectivos, por ejemplo en lo que se refiere al tipo de la enzima, al grado de pureza, el tipo de los compuestos separados, los valores de actividad o de estabilidad obtenidos. Por consiguiente se prefieren también los productos obtenidos a través de estos procedimientos de acuerdo con la invención. Un objeto de la invención, adicional además del procedimiento, lo representan soluciones enzimáticas concentradas que se han obtenido mediante un procedimiento descrito anteriormente.

50 Un objeto de la invención adicional son agentes que contienen una enzima, que se ha obtenido como producto intermedio como solución enzimática concentrada de acuerdo con el segundo objeto de la invención. De este modo es por ejemplo posible usar las soluciones enzimáticas concentradas obtenidas de acuerdo con la invención no en forma líquida sino convertirlas en una forma seca, altamente pura. Esto es posible por ejemplo a través de liofilización o mediante incorporación en un granulado sólido. Procedimientos para ello se describen en el estado de la técnica en detalle. En esta forma pueden almacenarse durante largo tiempo o incorporarse en otros agentes sólidos, por ejemplo en agentes de lavado y de limpieza sólidos.

55 Entre este objeto de la invención figuran por lo tanto también todos los tipos de agentes de limpieza concebibles, tanto concentrados como también agentes que van a aplicarse no diluidos, para el uso a escala comercial, en la lavadora o en el lavado a mano, o limpieza a mano. A estos pertenecen por ejemplo agentes de lavado para materiales textiles, alfombras o fibras naturales, para los que de acuerdo con la presente invención se usa la

denominación agente de lavado. A estos pertenecen por ejemplo también agentes lavavajillas para lavavajillas o agentes lavavajillas a mano o limpiadores para superficies duras tales como metal, vidrio, porcelana, cerámica, azulejos, piedra, superficies lacadas, plásticos, madera, o cuero; para esto se usa de acuerdo con la presente invención la denominación agentes de limpieza. Todo tipo de agente de lavado o de limpieza representa una forma de realización de la presente invención, siempre que esté enriquecido con una enzima, que se ha purificado de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención y que se ha procesado adicionalmente correspondientemente a este objeto de la invención.

Formas de realización de la presente invención comprenden todas las formas de administración establecidas de acuerdo con el estado de la técnica y todas las formas de administración convenientes de los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención. Entre éstas figuran en particular agentes sólidos, pulverulentos, opcionalmente también de varias fases, comprimidos o no comprimidos, así mismo pertenecen a estos por ejemplo: extruidos, granulados, comprimidos o bolsas, tanto en grandes envases como también empaquetados por porciones. También están incluidas formas de realización líquidas, pastosas o en forma de gel, siempre que para éstas la enzima tratada de acuerdo con la invención se introduzca en una forma procesada adicionalmente.

En una forma de realización preferida los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención contienen enzimas activas en una cantidad de 2 μg a 20 mg, preferentemente de 5 μg a 17,5 mg, de manera especialmente preferente de 20 μg a 15 mg, de manera muy especialmente preferente de 50 μg a 10 mg por gramo del agente.

Además de una enzima preparada de acuerdo con la invención y posiblemente enzimas adicionales un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención contiene opcionalmente sustancias contenidas adicionales, tales como por ejemplo estabilizadores enzimáticos, tensioactivos, por ejemplo tensioactivos no iónicos, aniónicos y/o anfóteros, blanqueantes, activadores de blanqueo, catalizadores de blanqueo, adyuvantes, disolventes, espesantes y opcionalmente como sustancias contenidas habituales agentes secuestrantes, electrolitos, blanqueantes ópticos, inhibidores del agrisamiento, inhibidores de la transferencia de color, inhibidores de espuma, colorantes y/o agentes aromáticos, principios activos anti-microbianos y/o absorbentes UV, por detallar solo las clases de sustancia más importantes. Formulaciones correspondientes se describen en detalle en el estado de la técnica.

Por el contrario, debido a las propiedades ventajosas de las enzimas líquidas obtenidas de acuerdo con la invención, en particular debido a su aspecto claro, y porque pueden usarse sin tratamiento adicional, se prefieren agentes que contienen una solución enzimática concentrada de manera correspondiente. En este sentido son de interés especial aquellos agentes que se encuentran en conjunto en forma líquida, pastosa o de gel. Estos pueden dosificarse fácilmente, contienen la enzima en la actividad deseada y presentan, al menos en lo que se refiere al componente enzimático, un aspecto agradable. Esto se ha representado al principio como deseable.

Esto es válido en especial medida para agentes de lavado y de limpieza que están concebidos para el usuario final. En una forma especialmente preferente en el caso de estos agentes de este objeto de acuerdo con la invención se trata por lo tanto de agentes de lavado o de agentes de limpieza. Estos entran en la definición indicada anteriormente y pueden contener las sustancias indicadas en la misma. Además correspondientemente a este objeto de la invención disponen de una forma líquida, en forma de gel o pastosa en conjunto, en la que pueden incorporarse los productos purificados, de acuerdo con la invención, de forma sencilla, es decir de acuerdo con métodos en sí conocidos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Purificación de una solución de proteasa concentrada

Separación de la biomasa

De acuerdo con la producción fermentativa del producto de valor proteasa, tal como se ha descrito en el documento WO 91/02792 A1, se separó la biomasa a través de los métodos conocidos de separación, microfiltración y filtración estéril prácticamente de forma completa. Después de esto siguió, tal como se describe en la solicitud WO 01/37628 A2, una concentración, es decir eliminación del disolvente por medio de una ultrafiltración, hasta que el concentrado de proteasa presentaba una actividad de 300.000 a 400.000 HPE por g, tal como puede determinarse de acuerdo con Raay, Saran y Verbeek de acuerdo con la publicación "Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Enzymkonzentraten und enzymhaltigen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln" in Tenside (1970), volumen 7, páginas 125 - 132. Así mismo con una solución de CaCl_2 al 30 % se ajustó un valor de pH de 7,5. La solución presentaba un porcentaje de sólidos inferior al 1 % en volumen, tal como puede determinarse por medio de una centrifuga de sobremesa o de laboratorio mediante centrifugación durante 10 minutos a 7.000 g. Además la proteasa contenida a una fuerza iónica de 1 a 20 mS/cm mostró una carga positiva.

Determinación del intervalo de trabajo óptimo

Se tomaron muestras de la solución obtenida después de la separación de la biomasa durante la ultrafiltración (valores hasta 400.000 HPE), o tal como se describe más adelante se concentraron a través de un separador y se

determinaron en función de la actividad respectiva tal como se indica anteriormente el porcentaje de sólidos. Las mediciones de actividad tuvieron lugar en cada caso a un valor de pH de 7,5, a una temperatura de 20 °C y a una fuerza iónica de 10 mS/cm. A partir de esto resultó la dependencia representada en la Tabla 1 y en la Figura 2.

Tabla 1: Dependencia del porcentaje de sólidos de la concentración de proteasa activa

Actividad [1000 HPE /g]	Porcentaje de sólidos de la solución [% en volumen]
0	0,2
200	0,5
400	1,2
600	1,5
800	3,0
1000	7,5

5

Tal como puede apreciarse en la misma el porcentaje de sólidos de una solución de proteasa concentrada aumenta por encima de aproximadamente 900.000 HPE/g de manera sobreproporcionada, de modo que como intervalo de trabajo óptimo con una actividad lo más alta posible y al mismo tiempo un porcentaje de sólidos lo más bajo posible se considera el intervalo de aproximadamente de 700.000 a 800.000 HPE/g.

10 **Etapas (a): Concentración de la solución enzimática hasta el intervalo de trabajo**

La solución enzimática obtenida en la etapa anterior en último lugar mediante ultrafiltración se concentró debido a este resultado de medición por medio de un evaporador de capa fina hasta el valor de 800.000 HPE/g. A este respecto se mantuvieron las siguientes condiciones: temperatura del producto por encima de 35 °C, vacío de aproximadamente 20 mbar, valor de pH principalmente constante de aproximadamente 7,5 y mantener bajo el porcentaje de sólidos del concentrado enzimático a menos del 3 % en volumen, para que las pérdidas en la etapa siguiente permanezcan lo más bajas posible.

15 **Etapas (b): Separación de los rellenos generados (sólidos)**

La separación de los sólidos (precipitaciones) generados mediante la concentración tuvo lugar a través de separación mecánica, basándose en el principio de la separación por fuerza de la gravedad o fuerza centrífuga. En concreto se usó para la separación de los sólidos un separador con descarga del sedimento discontinua; se trataba a este respecto del aparato BTPX 205 de la empresa ALFA LAVAL, con 11.700 m² de superficie de clarificación, que trabaja con un valor de g de 12.800 y un rendimiento de 200 l/h. De esta manera se obtuvo un concentrado enzimático principalmente libre de sólidos con menos del 0,2 % en volumen de contenido de sólidos, lo que se ha determinado tal como se indicó anteriormente. La actividad se encontraba además en aproximadamente 800.000 HPE/g.

20 **Etapas (c): Cromatografía de intercambio aniónico fuertemente básica**

La decoloración cromatográfica tuvo lugar en el lecho fijo por medio del intercambiador aniónico fuertemente básico del tipo DIAION® Pa 308L, que puede obtenerse de la empresa Mitsubishi, Tokio, Japón, o Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Alemania. A este respecto se controló la calidad de decoloración y con ello la estabilidad de la enzima a través de la relación de cantidad de lecho (BM; relación en volumen del concentrado enzimático con respecto a la resina) y el tiempo de permanencia; en concreto se ajustó una relación de 2 a 5 BM y una dosificación de 0,05 kg de solución enzimática por kg de resina y minuto. El principio se basaba en que la enzima se repelía por el material de soporte, y por lo tanto se arrastraba en la corriente de líquido, mientras que los colorantes se unían al soporte inmóvil. Una parte de la fracción de cola se condujo para el aumento del rendimiento de nuevo a través de la columna. A continuación se separaron mediante lavado con soluciones de NaCl y NaOH los compuestos adsorbidos a la columna, en particular los colorantes y se regeneró de esta manera el lecho fijo.

30 **Etapas (d): Mezcla, estabilización y ajuste de actividad con disolvente**

El filtrado con un valor de actividad de aproximadamente 700.000 HPE por g se mezcló directamente, es decir en línea en una mezcladora estática, con 1,2-propanodiol, que muestra al mismo tiempo un efecto estabilizador. Se tomaron aproximadamente el 55 % en volumen de porcentaje de disolvente.

La enzima líquida purificada a través de estas cuatro etapas presentaba las siguientes propiedades determinándose la actividad tal como se definió anteriormente y determinándose de acuerdo con la escala de color CIE usada internacionalmente, definida en la norma DIN 5033-3 y DIN 6174:

Actividad:	260.000 HPE/g
Color:	Valor de L > 96 Valor de b* < 14
Viscosidad:	< 10 mPas
Valor de pH:	aproximadamente 7

El líquido obtenido era prácticamente claro e inmediatamente después del procedimiento no mostraba ninguna precipitación posterior. Esta estabilidad adicional se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 2

5 Purificación de una solución de amilasa concentrada

La preparación de una solución de amilasa purificada de acuerdo con la invención tuvo lugar hasta las siguientes diferencias tal como en el Ejemplo 1. Se usó una carga de fermentador que contenía como sólido la α -amilasa, que se ha descrito en la solicitud WO 02/010356 A2. Dado que la α -amilasa presenta un punto isoeléctrico distinto que la proteasa, se ajustó ya antes en la etapa (a) un valor de pH de 6,25 y a lo largo de todo el procedimiento se mantuvo un valor de pH de 6 a 6,5, para mantener positiva la carga de la amilasa.

Determinación de la actividad

Para la determinación de la actividad amilolítica en TAU se usó un p-nitrofenilmaltoheptaósido modificado, cuya unidad de glucosa terminal está bloqueada por un grupo bencilideno; este se escinde por amilasa para dar p-nitrofenil-oligosacárido libre, que por su parte se hace reaccionar por medio de las enzimas auxiliares glucoamilasa y alfa-glucosidasa para dar glucosa y p-nitrofenol. Por lo tanto, la cantidad de p-nitrofenol liberada de la actividad amilasa es proporcional. La medición tiene lugar por ejemplo con el kit de ensayo de Quick-Start® de la empresa Abbott, Abbott Park, Illinois, Estados Unidos. El aumento de absorción (405 nm) en la sustancia de ensayo se detecta a 37 °C durante 3 minutos frente a un valor en blanco por medio de fotómetro. La calibración tiene lugar a través de un patrón enzimático de actividad conocida (por ejemplo, Maxamyl®/Purastar® 2900 de la empresa Genencor, Palo Alto, CA, EE.UU., con 2.900 TAU/g). La evaluación tiene lugar por medio de representación de la diferencia de absorción dE (405 nm) por minuto frente a la concentración enzimática del patrón.

Determinación del intervalo de trabajo óptimo

Durante la ultrafiltración y la posterior separación se tomaron muestras de diferente concentración tal como en el Ejemplo 1 y se determinó así mismo en función de la actividad respectiva el porcentaje de sólidos. Las mediciones tuvieron lugar en cada caso a un valor de pH de 6,25, a una temperatura de 20 °C y una fuerza iónica de 10 mS/cm. A partir de esto resultó la dependencia representada en la Tabla 2 y en la Figura 2.

Tabla 2: Dependencia del porcentaje de sólidos de la concentración de α -amilasa activa

Actividad [100 TAU /g]	Porcentaje de sólidos de la solución [% en volumen]
0	0,5
100	1,0
200	1,5
300	2,5
400	3,2
500	5,0

Tal como puede reconocerse a partir de la misma en caso de la amilasa existe una dependencia comparable (véase anteriormente) de la proteasa del porcentaje de sólidos con respecto a la concentración de enzima activa; ésta está indicada en la Figura 2 en 100 TAU por g. Por lo tanto el porcentaje de sólidos de una solución de amilasa concentrada aumenta por encima de 50.000 TAU/g de manera sobreproporcionada, de modo que como intervalo de trabajo óptimo con la máxima actividad posible y al mismo tiempo en menor porcentaje posible de sólidos, está indicado el intervalo de aproximadamente 35.000 a 45.000 TAU/g. De acuerdo con la invención se trabajará por lo tanto por debajo de este intervalo.

Mediante la etapa (a) llevada a cabo de manera análoga al Ejemplo 1 se ajustó por tanto un valor de actividad de 35.000 a 45.000 TAU por g y el procedimiento adicional se llevó a cabo tal como en el Ejemplo 1, es decir también en el mismo material de cromatografía de intercambio aniónico. En la etapa (d) se ajustó de manera análoga mediante mezclado con 1,2-propanodiol un valor de concentración de 9.000 TAU por g.

5 La enzima líquida purificada a través de estas etapas presentaba las siguientes propiedades:

Actividad: 9.000 TAU/g
 Valor de pH: aproximadamente 6,25

El líquido era prácticamente claro y, tal como la proteasa en el Ejemplo 1 inmediatamente a continuación del procedimiento no mostraba ninguna precipitación posterior.

Ejemplo 3

10 **Estabilidad en almacenamiento de la proteasa en una matriz de agente de lavado líquido**

Para la determinación de la estabilidad en almacenamiento de una proteasa purificada de acuerdo con la invención, en comparación con la enzima no purificada y con un producto comercial, en cada caso de la misma matriz de agente de lavado líquido, se produjeron las tres siguientes muestras: (1ª) una proteasa no purificada, tal como se encuentra de acuerdo con el Ejemplo 1 después de la ultrafiltración y antes de la etapa (a), (2ª) el producto comercial completamente purificado obtenible de la empresa Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca, Savinase®16.0 LEX y (3ª) la proteasa purificada de acuerdo con el Ejemplo 1. Las tres muestras se dispusieron previamente en una actividad de 260.000 HPE/g en una solución de 55 % en volumen de 1,2-propanodiol en agua, y se incorporaron en un porcentaje del 0,4 % en volumen en una matriz de agente de lavado líquido de composición habitual:

Las muestras de proteasa introducidas en esta matriz presentan en la escala de color CIE (véase anteriormente) valores de L de (1ª) 78, (2ª) 99, o (3ª) 97; es decir la proteasa purificada de acuerdo con la invención era prácticamente igual de clara que el producto purificado completamente. A lo largo de un período de tiempo de 12 semanas se tomaron muestras regularmente y se determinaron tal como se indica anteriormente las actividades residuales. En este sentido resultaron los valores indicados en la Tabla 3, que están representados gráficamente en la Figura 3.

25 Tabla 3: Estabilidad en almacenamiento de la proteasa en una matriz de agente de lavado líquido. Está indicada en cada caso la actividad residual en HPE en %

Muestra	0 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas
Proteasa no purificada	100	92,5	88,5	82,5
Savinase® 16.0 LEX	100	25,0	12,8	7,3
Proteasa purificada de acuerdo con el Ejemplo 1	100	80,0	72,0	60,0

Se reconoce que la proteasa purificada de acuerdo con la invención con un índice de color prácticamente igual con el producto completamente purificado es claramente más estable que el mismo, y que la proteasa purificada de acuerdo con la invención con respecto a la enzima no purificada oscura, pierde solo débilmente actividad en una matriz de agente de lavado.

Descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de flujo de bloques para la purificación de acuerdo con la invención de soluciones enzimáticas concentradas.

- Están representadas las siguientes etapas:
- (a) concentración de la solución enzimática hasta el intervalo de trabajo, retirándose la solución superior;
 - (a') desodorización opcional;
 - (b) separación de las precipitaciones generadas (sólidos);
 - (c) cromatografía de intercambio aniónico fuertemente básica, separándose por lavado los compuestos adsorbidos a la columna, en particular sólidos mediante lavado con medios correspondientes en etapas separadas y regenerándose la columna; y
 - (d) estabilización y ajuste de la actividad mediante adición de un disolvente.

Figura 2: Dependencia del porcentaje de sólidos de la concentración de enzima activa, determinado en los Ejemplos 1 y 2

El porcentaje de sólidos se indica en % en volumen tal como puede determinarse por medio de una

centrífuga de laboratorio a través de centrifugación durante 10 minutos a 7.000 g. La actividad de la proteasa está indicada en 1.000 HPE/g y la de la α -amilasa en 100 TAU/g. Están destacados los intervalos de trabajo considerados como óptimos de acuerdo con la presente solicitud.

Figura 3:

Estabilidad en almacenamiento de la proteasa en una matriz de agente de lavado líquido, determinado en el Ejemplo 3

Determinado para:

1. proteasa no purificada;
2. el producto comercial Savinase[®] 16.0 LEX de la empresa Novozymes; y
3. proteasa purificada de acuerdo con el Ejemplo 1.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de soluciones enzimáticas concentradas que contienen compuestos de Maillard de color, que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) preparación de una solución enzimática concentrada,
 (b) separación de sólidos, en particular de proteínas extrañas y/o enzimas inactivas y
 (c) separación de los compuestos de Maillard de color mediante adsorción a un intercambiador aniónico fuertemente básico, en el que el intercambiador aniónico fuertemente básico presenta grupos amonio cuaternarios como grupos funcionales, tiene una capacidad de intercambio de 0,7 a 1,2 meq/ml, presenta un tamaño de poro efectivo de 0,2 a 0,7 mm y se basa en un polímero de plástico poroso como material de soporte, en el que el intercambiador aniónico fuertemente básico en un intervalo de pH de 5 - 9 presenta capacidad de intercambio máxima,
- 10 **caracterizado porque** en la solución enzimática concentrada mediante la etapa (b) no se obtiene más del 1 % en volumen de sólido y las proteínas enzimáticas permanecen en solución a lo largo de todo el procedimiento.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa (a) se introduce un concentrado de ultrafiltración.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la etapa (a) se lleva a cabo por medio de un evaporador de capa fina.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** mediante la etapa (a) se prepara un concentrado enzimático, que no contiene más del 4 al 20 % en peso, preferentemente no más del 4,5 al 15 % en peso, de manera especialmente preferente no más del 5 al 10 % en peso de sustancia seca.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** a continuación de la etapa (a) con la etapa (a') se lleva a cabo una desodorización de la solución enzimática concentrada.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la etapa (b) se lleva a cabo con un procedimiento de separación mecánico, preferentemente basado en la separación por la fuerza de la gravedad o por la fuerza centrífuga.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** la etapa (b) se lleva a cabo con un separador, preferentemente un separador que funciona de manera continua, de manera especialmente preferente uno con descarga de muestra discontinua.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** en la solución enzimática concentrada mediante la etapa (b) no se obtiene más del 1 % en volumen, preferentemente no más del 0,7 % en volumen, de manera especialmente preferente no más del 0,5 % en volumen de sólido.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) presenta capacidad de intercambio máxima en el intervalo de pH de 5 a 9, preferentemente de 6 a 8.
- 35 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) presenta como grupos funcionales grupos amonio cuaternarios sustituidos con al menos dos grupos alquilo, preferentemente con al menos dos grupos alquilo con 1 o 2 átomos de carbono, de manera opcional adicionalmente con un grupo hidroxilo que presenta 1 o 2 átomos de carbono.
- 40 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) presenta como grupos funcionales grupos trimetil-amonio o dimetiletanol-amonio.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) presenta una capacidad de intercambio de 0,8 a 1,1 meq/ml, preferentemente de 0,9 a 1,0 meq/ml.
- 45 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) presenta tamaños de poro efectivos de 0,3 a 0,6 mm, preferentemente de 0,4 a 0,5 mm.
14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el intercambiador aniónico fuertemente básico para la etapa (c) se basa en un copolímero de estireno-DVB.
- 50 15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** la etapa (c) se lleva a cabo con un volumen de lecho de 1 a 10, preferentemente del 1,5 a 7, de manera especialmente preferente de 2 a 4.

16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** la etapa (c) tiene lugar con un tiempo de permanencia promedio de 0,01 a 0,2 g, preferentemente de 0,025 a 0,1 g, de manera especialmente preferente de 0,04 a 0,06 g y de manera muy especialmente preferente de 0,05 g de enzima por g de material de soporte y minuto.
- 5 17. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** la etapa (c), en particular la separación entre fracción de cabeza y producto objetivo y/o producto objetivo y fracción de cola se controla a través de la conductividad del eluato.
18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado porque** la etapa (c) tiene lugar con recirculación de al menos una parte de la fracción de cabeza y/o de la fracción de cola de la cromatografía de intercambio iónico.
- 10 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado porque** a continuación de la etapa (c) en una etapa (d) mediante dilución se ajusta un valor de concentración más bajo.
20. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado porque** a continuación de la etapa (c), dado el caso antes, después o al mismo tiempo que una dilución de acuerdo con la reivindicación 19, se añade un estabilizador, preferentemente al mismo tiempo con la etapa (d).
- 15 21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, **caracterizado porque** en el caso del estabilizador se trata de un polioliol, preferentemente 1,2-propanodiol.
22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, **caracterizado porque** el estabilizador se añade en un intervalo de cantidades del 40 al 70 % en volumen, preferentemente del 45 al 65 % en volumen, de manera especialmente preferente del 50 al 60 % en volumen del volumen final.
- 20 23. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 19 a 22, **caracterizado porque** el producto de procedimiento se ajusta a un contenido de sustancia seca del 2 al 15 % en peso, preferentemente del 5 al 13 % en peso, de manera especialmente preferente del 8 al 12 % en peso.
24. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 19 a 23, **caracterizado porque** el producto de procedimiento se ajusta a un valor de viscosidad de 0,001 a 0,02 Ns/m² (de 1 a 15 mPas), preferentemente de 0,001 a 0,015 Ns/m² (de 1 a 15 mPas), de manera especialmente preferente de 0,001 a 0,01 Ns/m² (de 1 a 10 mPas) a 25 °C.
- 25 25. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 19 a 24, **caracterizado porque** el producto de procedimiento se ajusta a un porcentaje de sedimento inferior al 1 % en volumen, preferentemente inferior al 0,75 % en volumen, de manera especialmente preferente inferior al 0,5 % en volumen.
- 30 26. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado porque** se trata de una enzima que puede usarse técnicamente, preferentemente de una hidrolasa o una oxidoreductasa, de manera especialmente preferente de una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa o de una peroxidasa.
- 35 27. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado porque** se trata de una proteasa, preferentemente una proteasa alcalina.
28. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, **caracterizado porque** en particular en la etapa (c) se lleva a cabo a un valor de pH de 5 a 9, preferentemente de 6 a 8,5, de manera especialmente preferente de 7 a 8.
29. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 27 o 28, **caracterizado porque** el producto de la etapa (a) se ajusta a un valor de actividad de 600.000 a 900.000, preferentemente de 650.000 a 850.000, de manera especialmente preferente de 700.000 a 800.000 HPE por g.
- 40 30. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 22 a 24, **caracterizado porque** el producto final se ajusta a un valor de actividad de 150.000 a 500.000, preferentemente de 175.000 a 300.000, de manera especialmente preferente de 200.000 a 260.000 HPE por g.
31. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado porque** se trata de una α -amilasa, preferentemente con un valor óptimo de pH alcalino.
- 45 32. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 26 o 31, **caracterizado porque** el producto de la etapa (a) se ajusta a un valor de actividad de 30.000 a 50.000 TAU por g, preferentemente de 35.000 a 45.000 TAU por g.
33. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 31 a 32, **caracterizado porque** el producto final se ajusta a un valor de actividad de 4.000 a 14.000, preferentemente de 6.000 a 12.000, de manera especialmente preferente de 8.000 a 10.000 TAU por g.
- 50

34. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado porque** se trata de una celulasa, preferentemente con un valor óptimo de pH alcalino.

Figura 1

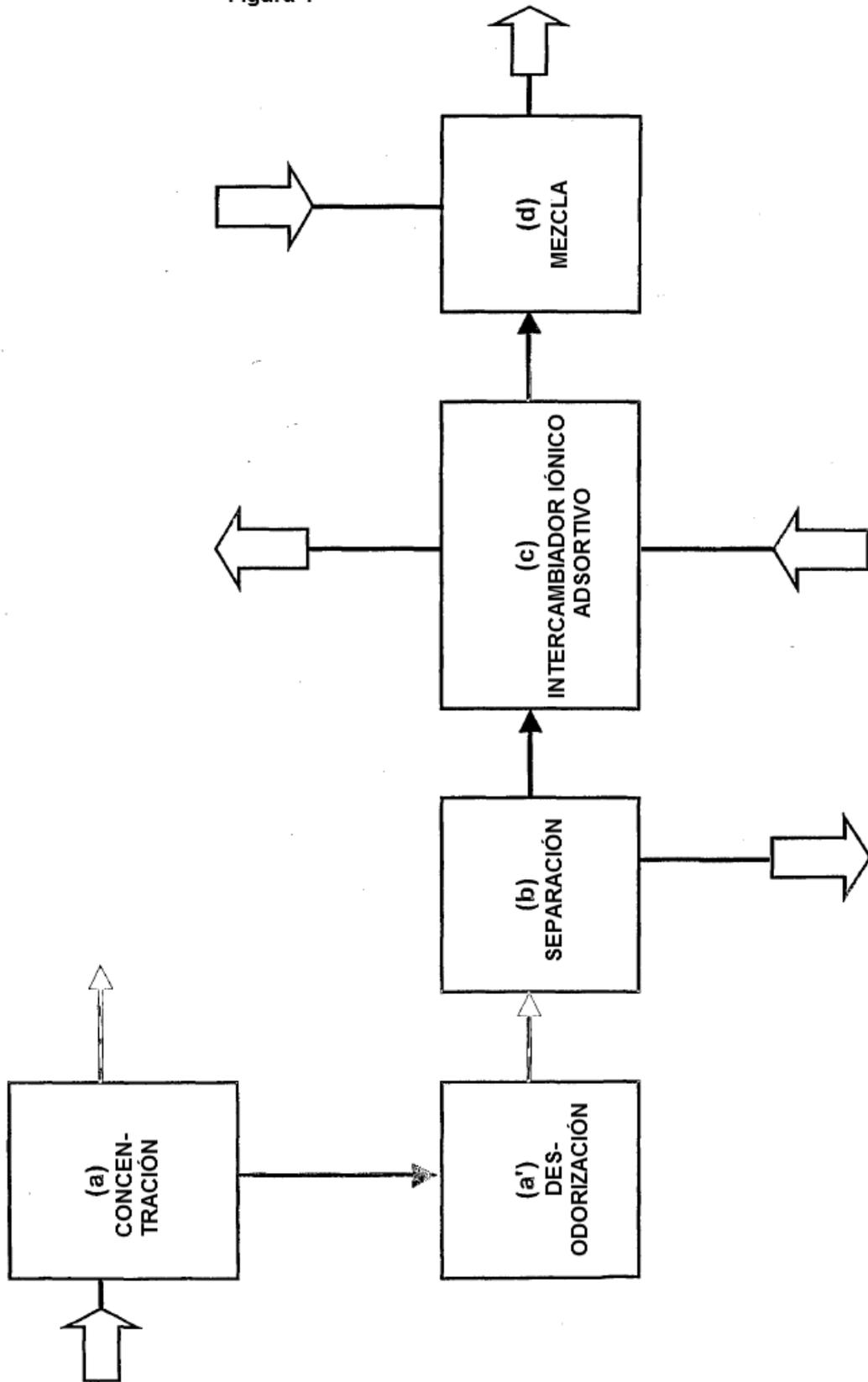


Figura 2

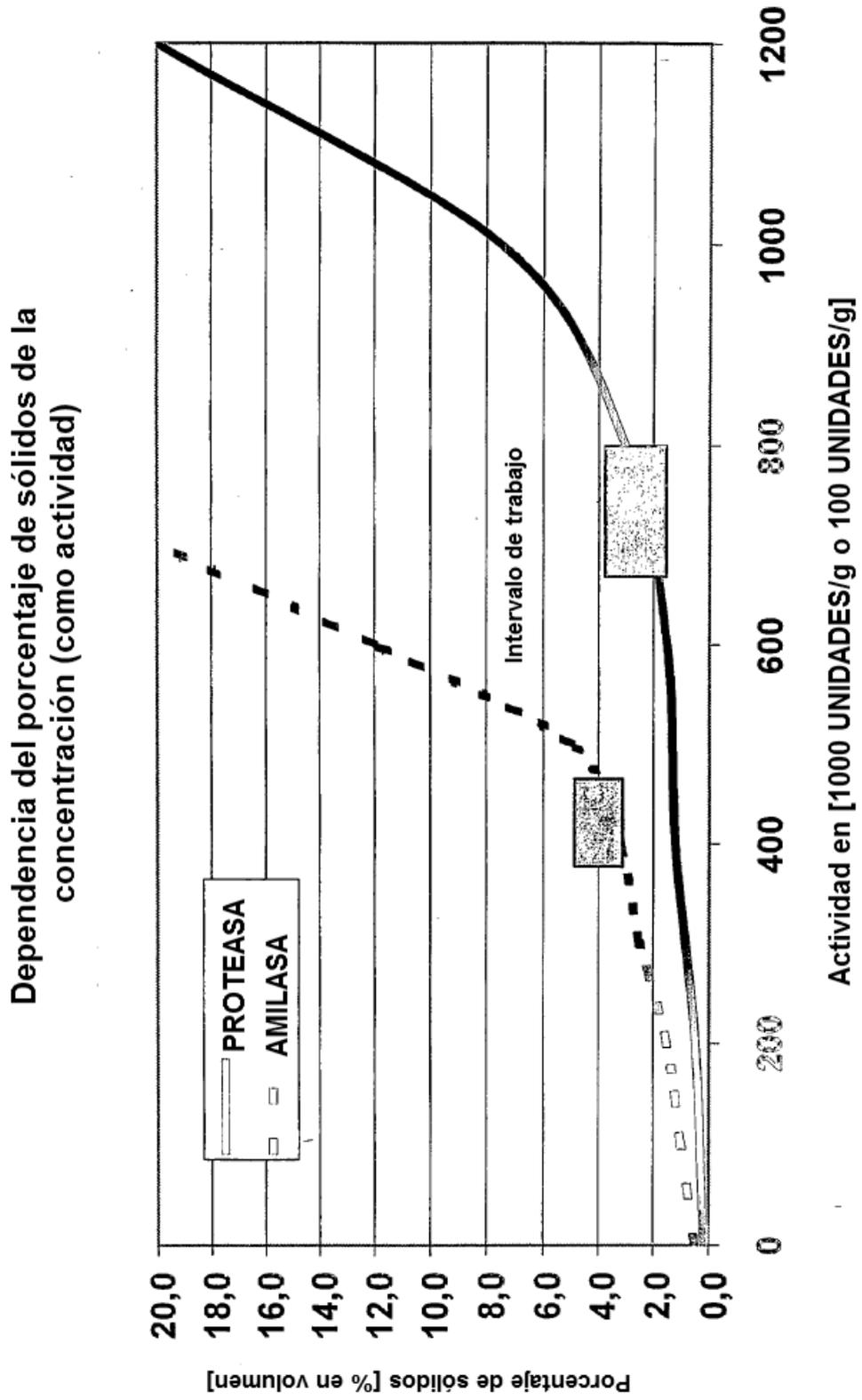


Figura 3

