



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 874**

51 Int. Cl.:
C11D 3/386 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01955906 .1**
96 Fecha de presentación : **20.07.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1303582**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

54 Título: **Estabilización de enzimas.**

30 Prioridad: **22.07.2000 US 220208 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2009

73 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es: **Becker, Nathaniel, T.;**
Bott, Richard, T.;
Bowden, Shauna, L.;
Heng, Meng, Hong;
Paech, Christian y
Kosola, Antti, V.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 329 874 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

Estabilización de enzimas.

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para estabilizar una o más enzimas proteasas de especies de *Bacillus* en un medio líquido, y a formulaciones enzimáticas líquidas estabilizadas, con las enzimas proteasas estabilizadas.

2. Antecedentes

La estabilización de la actividad enzimática es un problema persistente en todas las áreas de la tecnología en las que hay posibilidad de que se apliquen enzimas. La estabilidad, en este sentido, incluye la resistencia a la disminución en la actividad enzimática antes de la utilización, p.ej., bajo condiciones de almacenamiento. La estabilización de enzimas en formulaciones líquidas es particularmente un problema. Por ejemplo, un concentrado líquido de enzimas preformulado puede ser almacenado a veces durante semanas o meses antes de ser mezclado finalmente hasta un producto final (p.ej., un producto para el cuidado personal, tal como una crema de manos; o un producto de limpieza, tal como un detergente líquido). De manera similar, los productos líquidos formulados que contienen enzimas pueden reposar en almacenamiento durante largos periodos de tiempo antes de su uso, así mismo. Por diversas razones, la actividad de las enzimas en las formulaciones líquidas disminuye, por regla general, a lo largo del tiempo.

La técnica anterior ha intentado hacer frente a este problema. Por ejemplo, a menudo se añaden compuestos orgánicos, tales como formiato de sodio y propilenglicol o glicerol, a formulaciones líquidas de enzimas. La patente de EE.UU. N° 3.296.094, de Theodore Cayle, expedida el 3 de enero de 1967, describe disoluciones acuosas de una enzima proteolítica, en particular papaína, que son estabilizadas contra la pérdida de actividad proteolítica en el almacenamiento incorporando una combinación de glicerol y colágeno parcialmente hidrolizado y solubilizado. La solicitud de patente internacional WO 00/12663 A describe una composición líquida de enzimas estable para limpiar lentes de contacto, que comprende una enzima, tal como subtilisina, uno o más poliol(es), un compuesto de borato/ácido bórico, iones de calcio y agua. La patente de EE.UU. N° 4.318.818, de Letton *et al.*, expedida el 9 de marzo de 1982, describe detergentes líquidos que contienen enzimas y un sistema estabilizador de enzimas que comprende iones de calcio y un ácido carboxílico o sal de bajo peso molecular, preferiblemente un formiato. La composición contiene preferiblemente un tensioactivo aniónico y un ácido graso saturado. La patente de EE.UU. N° 4.404.115, de Tai, expedida el 13 de septiembre de 1983, describe composiciones de limpieza que contienen enzimas, pentaborato de metal alcalino, sulfito de metal alcalino y un poliol. Aunque un tanto eficaces, los aditivos tales como el formiato y otras sales orgánicas son por desgracia costosos, y, por tanto, aumentan significativamente el coste del concentrado líquido de enzimas y el producto final. Además, en algunos casos se desean formulaciones que sean aceptables para el uso alimentario, farmacéutico o cosmético, y ciertas sales como el formiato de sodio pueden no ser aceptables o adecuadas para este propósito.

El uso de sales inorgánicas como agentes de estabilización para enzimas se conoce en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.460.658, de Nakagawa *et al.*, expedida el 24 de octubre de 1995, describe una disolución para la limpieza de lentes de contacto basada en enzimas de la que se dice que es estabilizada con una combinación de un alcohol polihidroxilado (5-30%) y una sal de un metal alcalino (1-5%). La patente de Nakagawa *et al.* enseña que los niveles del alcohol polihidroxilado son menores que 30% para mantener la actividad de las enzimas en la aplicación de la disolución para lentes de contacto. La xilanasa fue estabilizada con un poliol (20-40%) y formiato o cloruro de potasio (4-8%) como se describe en un estudio titulado "Development of A Method for the Stabilization and Formulation of Xylanase from *Trichoderma* Using Experimental Design", R. Spencer Fisk y Curran Simpson, reportado en *Studies in Organic Chemistry*, vol. 47, *Stability and Stabilization of Enzymes*, Elsevier, editado por W. J. J. Van Den Tweel, A. Harder, R. M. Buitellar, 1992. Este estudio describe el uso de no más que 40% de poliol para mantener la actividad de la xilanasa.

Una formulación cosmética que tiene una enzima estabilizada usando un poliol que se une al agua al 30-99% y que está parcial o totalmente complejoado con un polímero acrílico o metacrílico se describe en la patente de EE.UU. N° 5.830.449, de Afriat *et al.*, expedida el 3 de noviembre de 1998, y la patente de EE.UU. N° 5.703.041, de Afriat *et al.*, expedida el 30 de diciembre de 1997. La formulación cosmética también puede incluir una sal inorgánica (2 a 12%) como agente de estabilización secundario.

Claramente, hay una continua necesidad de formulaciones líquidas que contengan enzimas que estén estabilizadas y exhiban una alta actividad a lo largo del tiempo. Particularmente, hay una necesidad de formulaciones líquidas estabilizadas de proteasa que sean fáciles de procesar, altamente eficaces, baratas de producir en relación a las formulaciones estabilizantes usadas con anterioridad, relativamente inactivas hasta que se incluyan finalmente como ingrediente en una aplicación seleccionada, y también útiles para formulaciones que sean bien toleradas fisiológicamente.

Compendio de la invención

Se ha descubierto que la combinación de un alto nivel de sales de haluros de metales alcalinos, tales como cloruro de sodio (al menos 4% ó 5% en peso, o más alto), en combinación con un disolvente de poliol, tal como glicerol, propilenglicol, sacarosa, etc. (30% en peso, o más alto) proporciona un alto nivel de estabilidad térmica para formulaciones de proteasa (producida a partir de especies de *Bacillus*, p.ej., *subtilisina*).

La presente invención proporciona un método para estabilizar una o más enzimas proteasas de especies de *Bacillus* en un medio líquido. En una realización, el método de la invención consiste en formular en el medio líquido un alto nivel de una sal de haluro de metal alcalino en combinación con un disolvente de poliol.

La sal de haluro de metal alcalino puede ser, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, y fluoruro o bromuro de sodio o de potasio. También se pueden usar sales de litio. Adicionalmente, se pueden usar otras sales inorgánicas, tales como sales de sulfatos o sulfitos, carbonatos, fosfatos, silicatos o nitratos. Una realización preferida contempla al menos entre 4-12% (p.ej., al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, al menos 10%, al menos 11% y/o al menos 12%) de cloruro de sodio. En una realización, el cloruro de sodio comprende entre aproximadamente 5-12%, preferiblemente entre aproximadamente 8-12% en peso, de la formulación líquida.

El poliol puede estar presente, por ejemplo, a un nivel de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y/o al menos 95%. Por ejemplo, una realización contempla entre 50 y 98% de poliol, preferiblemente entre 55 y 95% de poliol, preferiblemente entre 80 y 90% de poliol, y lo más preferiblemente de 50 a 80% de poliol. Los polioles adecuados incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sacarosa, entre otros.

Entre las enzimas proteasas de especies de *Bacillus* que pueden ser estabilizadas mediante las enseñanzas de la presente memoria, una enzima preferida es una *subtilisina*.

El medio líquido de la invención puede ser, por ejemplo, un concentrado líquido de enzimas o un producto formulado que incluye al menos una proteasa. En una realización, el medio líquido es un producto formulado seleccionado del grupo que consiste en productos para el cuidado personal, productos para el cuidado de la salud y productos de limpieza/detergencia. El medio líquido se puede usar, por ejemplo, en la formulación de cremas de manos, detergentes líquidos y similares.

La presente invención proporciona además una formulación líquida que proporciona un entorno estabilizante de enzimas. En una realización, la formulación incluye una o más proteasas de una especie de *Bacillus*, un alto nivel de una sal de haluro de metal alcalino y un disolvente de poliol.

La sal de haluro de metal alcalino puede ser, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, y fluoruro o bromuro de sodio o de potasio. También se pueden usar sales de litio. Adicionalmente, se pueden usar otras sales inorgánicas, tales como sales de sulfatos o sulfitos, carbonatos, fosfatos, silicatos o nitratos. En una realización, el cloruro de sodio está presente a un nivel de entre 4-12% (p.ej., al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, al menos 10%, al menos 11%, hasta e incluyendo 12%). En un ejemplo de formulación, el cloruro de sodio comprende aproximadamente 8-12% en peso de la formulación líquida.

El poliol está presente preferiblemente, por ejemplo, a un nivel de al menos 30%. Ciertas realizaciones contemplan un nivel de poliol de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y/o al menos 95%. Una realización contempla entre 50 y 98% de poliol, preferiblemente entre 55 y 95% de poliol, preferiblemente entre 80 y 90% de poliol, y lo más preferiblemente de 50 a 80% de poliol. Los polioles adecuados incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sacarosa, entre otros.

Entre las una o más proteasas de una especie de *Bacillus* que son estabilizadas en la formulación, una realización preferida contempla la inclusión de una *subtilisina*.

En una realización, la formulación líquida es un concentrado líquido de enzimas o un producto formulado que incluye al menos una proteasa producida a partir de especies de *Bacillus*, tal como una *subtilisina*. La formulación líquida puede ser, por ejemplo, un producto formulado tal como un producto para el cuidado personal, un producto para el cuidado de la salud, un producto de limpieza, un producto de detergencia, entre otros.

La presente invención también proporciona una formulación líquida de enzimas estabilizada, que incluye: (i) una proteasa de especies de *Bacillus*, tal como *subtilisina*; (ii) al menos 5% en peso de una sal de haluro de metal alcalino, tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, fluoruro o bromuro de sodio o de potasio, o sales de litio. Adicionalmente, se pueden usar otras sales inorgánicas, tales como sales de sulfatos o sulfitos, carbonatos, fosfatos, silicatos o nitratos; y (iii) al menos 30% en peso de un disolvente de poliol, tal como un glicol. Preferiblemente, la formulación incluye una *subtilisina* que es estabilizada para exhibir al menos aproximadamente el 98% de actividad remanente después de 22 días a 37 grados C. En una realización, la *subtilisina* estabilizada incluye una sustitución de aminoácidos en la posición 217 (p.ej., Y217L).

ES 2 329 874 T3

Estos y otros rasgos, aspectos y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, junto con las reivindicaciones anexas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para estabilizar enzimas proteasas de especies de Bacillus y formulaciones líquidas que incluyen las enzimas estabilizadas utilizando un poliol y una sal de haluro de metal alcalino.

Los porcentajes en la presente memoria se expresan como porcentaje en peso de la formulación líquida.

Los inventores de la misma han determinado que la combinación de un alto nivel de una sal de haluro de metal alcalino (p.ej., cloruro de sodio) en combinación con un disolvente de poliol (p.ej., glicol) proporciona un alto nivel de estabilidad térmica para formulaciones líquidas de enzimas (p.ej., proteasas producidas a partir de especies de Bacillus).

Las formulaciones de la presente invención incluyen al menos aproximadamente 30% de poliol o alcohol polihidroxilado; por ejemplo entre aproximadamente 50 y aproximadamente 98%, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 80 y aproximadamente 90%, y/o entre aproximadamente 50-80% de poliol. Un ejemplo de formulación líquida adecuada para su inclusión en aplicaciones para el cuidado personal, como se contempla en la presente memoria, incluye entre aproximadamente 50% y aproximadamente 80% de glicerol. Otros polioles adecuados incluyen, y no se limitan a, propilenglicol, etilenglicol, sorbitol, manitol, eritritol, dulcitol e inositol. Tal formulación líquida se puede formular adicionalmente hasta, por ejemplo, una crema de manos, o similar. Una formulación líquida para aplicaciones de detergentes líquidos, como se contempla en la presente memoria, incluye entre aproximadamente 33 y aproximadamente 40% de propilenglicol. Otro ejemplo de formulación líquida para aplicaciones para el cuidado personal incluye aproximadamente 60% de glicerol. El nivel de poliol es aproximadamente 50-80% para producir un compuesto que tenga enzimas relativamente inactivas hasta que tal compuesto es incluido finalmente en una aplicación específica.

Las formulaciones de la presente invención incluyen al menos aproximadamente 5% de una sal de haluro de metal alcalino, tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, y fluoruro o bromuro de sodio o de potasio, o sales de litio. Adicionalmente, se pueden usar otras sales inorgánicas, tales como sales de sulfatos o sulfitos, carbonatos, fosfatos, silicatos o nitratos. En una realización preferida, la sal de haluro de metal alcalino es cloruro de sodio. El cloruro de sodio puede estar presente, por ejemplo, a un nivel de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 6%, al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 8%, al menos aproximadamente 9%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 11%, y/o al menos aproximadamente 12%. En una realización, una formulación líquida de enzimas incluye entre aproximadamente 5% y aproximadamente 12% de cloruro de sodio (p.ej., preferido a aproximadamente 8% de cloruro de sodio). En otra realización preferida, la formulación líquida de enzimas incluye aproximadamente 10% de cloruro de sodio.

Las enzimas para uso en la presente invención incluyen proteasas producidas a partir de cualquier especie de Bacillus, e incluyen mutantes que retienen su estructura y función similares a las de las proteasas de Bacillus.

Las proteasas de especies de Bacillus preferidas incluyen, por ejemplo, Purafect y Properase, de Genencor International, Inc., o Savinase, Esperase, Alcalase disponibles en Novozymes A/S. Se pueden incluir una o más enzimas en las formulaciones de la presente invención.

Las formulaciones líquidas de enzimas estabilizadas de la presente invención se pueden aplicar en diversos campos, incluyendo los campos del cuidado personal (p.ej., proteasa para uso en cremas de manos, y similares), y limpieza (p.ej., proteasa para uso en detergentes líquidos, y similares), entre otros. Por ejemplo, las formulaciones líquidas de enzimas pueden ser concentrados líquidos de enzimas que son útiles para una formulación posterior hasta productos finales, y/o pueden ser productos formulados finales, tales como cremas para la piel, lociones, jabones líquidos, detergentes líquidos, etc.

Las formulaciones líquidas de enzimas de la presente invención son particularmente eficaces en la estabilización de enzimas durante el almacenamiento, dentro de un intervalo de temperaturas de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 grados Celsius, p.ej. a o alrededor de la temperatura ambiente (22-25 grados Celsius).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1

Se formuló subtilisina BPN[®] Y217L a 5-7 gE/l en una base de 80-90% de glicerol, KH₂PO₄ 1 mM a pH 5,0. El método de formulación implica, de manera general, lo siguiente: se añadió el reactivo de CaCl₂ 1 mM al reactivo de glicerol, seguido de la adición de la enzima seleccionada. Después se añadió agua y la mezcla resultante se dejó disolver durante una noche a 4°C. La concentración de la sal seleccionada se preparó disolviendo la sal en NaOAc 1 M antes de su adición a la enzima disuelta. Después, se añadió carbón CP al 3% a la combinación de enzima y sal

ES 2 329 874 T3

y el compuesto resultante se mezcló a 22°C durante aproximadamente 6 horas. Después, se filtró el compuesto y la disolución resultante se almacenó para los estudios de estabilidad expuestos más adelante.

5 Como se muestra en la Tabla 1, la formulación fue ensayada sin estabilización adicional y con estabilización usando tres estabilizantes (acetato de sodio, cloruro de sodio y formiato de sodio).

TABLA 1

Estudio de estabilidad I

Condiciones básicas para todas las muestras

* 50 ppm de Ca²⁺

Disolución de 10 g de la enzima

* Temperatura 25C/37C

Experimentos				Actividad del producto
B0	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Acetato de sodio; 8%	Glicerol; 82%	6,75 gE/l
B1	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Cloruro de sodio; 8%	Glicerol; 82%	6,75 gE/l
B2	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Formiato de sodio; 8%	Glicerol; 82%	6,75 gE/l
B3	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Ninguno	Glicerol; 90%	6,75 gE/l
B4	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Ninguno	Glicerol; 90%	3,37 gE/l
B5	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Ninguno	Glicerol; 45% / Propilenglicol; 45%	6,75 gE/l
B6	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 antes de las adiciones; 10%	Ninguno	Propilenglicol; 90%	6,75 gE/l
B7	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,0 después de las adiciones; 10%	Ninguno	Glicerol; 82%	6,75 gE/l
B8	KH ₂ PO ₄ 10 mM a pH 5,5 antes de las adiciones; 10%	Ninguno	Glicerol; 82%	6,75 gE/l

Se hizo un seguimiento de los niveles de actividad para todas las formulaciones anteriores, como exhiben los datos de la Tabla 2, la cual demuestra que el cloruro de sodio es un agente muy eficaz para la estabilización de la subtilisina (nótese, en particular, B1). La actividad enzimática remanente a los 22 días utilizando los tres estabilizantes mostrados estuvo entre 96-98%, comparado con un valor de sólo 81% en las formulaciones restantes que no incluyeron acetato de sodio, cloruro de sodio o formiato de sodio.

ES 2 329 874 T3

TABLA 2

37° C

Estudio de estabilidad de la subtilisina

Actividades por ensayo AAPF-pNA en $\Delta\text{UA min}^{-1}\text{ml}^{-1}$

Día	Amortiguador									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	206	211	233	229	112	234	204	200	204	
1	212	216	239	238	113	238	214	171	214	
6	205	210	228	214	98	217	177	161	198	
22	196	206	224	185	49	179	109	142	160	
41	186	208	212	150	11	163	62	116	138	
66	186	205	202	129	7	132	32	33	113	
94	183	192	183						88	
Día	% de actividad que queda				Amortiguador					
	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
1	103	102	102	104	101	102	105	85	105	
6	100	100	98	94	88	93	87	80	97	
22	96	98	96	81	43	77	54	71	78	
41	91	99	91	66	10	70	30	58	67	
66	91	97	87	57	6	57	16	16	55	
94	89	91	79						43	

Se encontró que la muestra de NaCl al 8% tenía una alta estabilidad (más de 98% de actividad remanente después de 22 días a 37 grados C y 100% después de 23 días a 37 grados C). El dato demuestra además que siguió habiendo un alto nivel de actividad (al menos 90%) en presencia de cloruro de sodio a los 94 días.

La Tabla 3 que se presenta a continuación representa el mismo ejemplo que el anterior, realizado a 25°C.

TABLA 3

25 °C

Estudio de estabilidad de la subtilisina

Actividades por ensayo AAPF-pNA en $\Delta\text{UA min}^{-1}\text{ml}^{-1}$

Día	Amortiguador									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	206	211	233	229	112	234	204	200	204	
2	205	216	223	227	108	227	200	184	197	
23	204	212	242	214	94	223	188	186	203	
30	200	213	220	214	85	215	182	153	197	
65	201	206	227	192	40	187	158	135	174	
94	189	197	222						158	
Día	% de actividad que queda				Amortiguador					
	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
2	100	102	96	99	97	97	98	92	96	
23	99	101	104	93	84	95	93	83	99	
30	97	101	94	93	76	92	90	77	97	
65	98	98	97	84	35	80	78	68	77	
94	92	93	95						77	

ES 2 329 874 T3

El Ejemplo 2 ilustra los resultados de un estudio diseñado para aumentar la deseabilidad comercial de formulaciones líquidas de enzimas y para facilitar la fabricación de tales formulaciones. Por consiguiente, el Ejemplo 2 ilustra los sorprendentes resultados conseguidos reduciendo la concentración de glicerol y aumentando la concentración de sal en la formulación.

La subtilisina BPN' Y217L se formuló como se expone en la Tabla 4 que se presenta a continuación en una base de 70-82% de glicerol y KH₂PO₄ 1 mM.

TABLA 4

Estudio de estabilidad 2

Condiciones básicas para todas las muestras

* 50 ppm de Ca²⁺ Disolución de 10 g de la enzima

* Temperatura 25C/37C

Forma nº	Amortiguador de la enzima	Sal ** (g)	Tipo de sal	Glicerol ** (g)	Actividad enzimática diana (mg/mL)	Enzima (% en peso)	Densidad de la forma final
B1	K-Phos 10 mM, pH 5,0	8	NaOAC	82	6,75	0,54	1,25
B2	K-Phos 10 mM, pH 5,0	8	NaCl	82	6,75	0,54	1,25
B3	K-Phos 10 mM, pH 5,0	8	NaOAC.3H ₂ O	82	1,3	0,104	1,25
B4	K-Phos 10 mM, pH 5,0	12	NaOAC.3H ₂ O	70	1,3	0,104	1,25
B5	K-Phos 10 mM, pH 5,5	8	NaCl	82	1,3	0,104	1,25
B6	K-Phos 10 mM, pH 5,5	6	NaCl	82	1,3	0,104	1,25
B7	K-Phos 10 mM, pH 5,5	8	NaCl	70	1,3	0,104	1,25
B8	K-Phos 10 mM, pH 5,5	10	NaCl	60	1,3	0,104	1,25
B9	K-Phos 100 mM, pH 5,5	6	NaCl	82	1,3	0,104	1,25
B10	K-Phos 100 mM, pH 5,5	8	NaCl	82	1,3	0,104	1,25
B11	K-Phos 100 mM, pH 5,5	8	NaCl	70	1,3	0,104	1,25
B12	K-Phos 100 mM, pH 5,5	10	NaCl	60	1,3	0,104	1,25
B13	K-Phos 100 mM, pH 5,5	8	NaOAC.3H ₂ O	82	1,3	0,104	1,25
B14	K-Phos 100 mM, pH 5,5	12	NaOAC.3H ₂ O	70	1,3	0,104	1,25

Como muestran los sorprendentes datos de la Tabla 5 que se presenta a continuación, se puede conseguir una formulación de glicerol/sal estable que se fabrica fácilmente aumentando la concentración de sal, permitiendo de este modo una reducción en la cantidad de glicerol en la formulación. La Tabla 5 ilustra que una formulación con 60% de glicerol y 10% de sal es excepcionalmente estable.

ES 2 329 874 T3

TABLA 5

Estudio de estabilidad de la subtilisina: 25°C

Actividades por ensayo AAPF-pNA en Δ UA min⁻¹ml⁻¹

Día	Amort.													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	323	327	63,3	63,7	63,8	66,4	63,4	66,5	65,3	66,9	65,4	63,5	64,9	63,2
118	310	327	63,6	61,4	66,9	60,9	61,7	66,9	60,9	63,2	66,4	64,4	63,8	62,6
174	320	336	65,9	63,7	62,6	59,1	63,6	68,6	61,7	64,6	64,1	66,8	65,6	63,7
279	301	301	57,7	59,9	51,8	50,8	62,6	62,1	53,8	54,8	59,9	59,4	57,4	59,0

% de la actividad original

Día	Amort.													
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
118	96,0	100,0	100,5	96,4	104,8	91,6	97,3	100,7	93,3	94,5	101,6	101,4	98,2	99,0
174	99,2	102,6	104,2	100,1	98,1	88,9	100,2	103,1	94,6	96,5	98,0	105,1	101,1	100,9
279	93,2	91,8	91,2	94,0	81,2	76,5	98,6	93,3	82,5	81,9	91,6	93,5	88,4	93,4

TABLA 6

37° C

Actividades por ensayo AAPF-pNA en Δ UA min⁻¹ml⁻¹

Día	Amort.													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	323	327	63,3	63,7	63,8	66,4	63,4	66,5	65,3	66,9	65,4	63,5	64,9	63,2
9	313	316	63,1	64,0	64,3	64,2	62,7	63,0	61,6	64,1	60,7	61,4	62,4	61,2
29	311	320	63,3	63,2	64,1	63,4	62,3	64,4	60,4	64,3	61,1	61,7	62,7	61,4
112	269	298	57,9	55,3	62,4	48,4	64,7	63,4	48,9	62,2	60,9	58,9	57,4	56,5
173	281	233	54,7	50,3	57,3	12,4	61,7	64,6	27,7	60,7	60,7	61,7	55,9	52,6
280	242	43,9	48,3	44,6	6,79	4,42	58,9	58,3	4,76	32,3	52,5	55,5	47,1	42,4

% de la actividad original

Día	Amort.													
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	97,0	96,6	99,8	100,5	100,7	96,6	98,9	94,7	94,4	95,8	92,8	96,7	96,2	96,8
29	96,4	97,7	100,0	99,2	100,4	95,4	98,1	96,9	92,5	96,0	93,4	97,2	96,7	97,1
112	89,4	90,9	91,4	86,9	97,8	72,9	102,0	95,4	75,0	93,0	93,2	92,7	88,4	89,4
173	87,0	71,2	86,4	79,0	89,8	18,7	97,3	97,1	42,5	90,7	92,9	97,2	86,1	83,3
280	75,1	13,4	76,3	70,0	10,6	6,6	89,6	87,7	7,3	48,3	80,3	87,4	72,6	67,1

Ensayo de la proteasa

Los Ejemplos 1 y 2 midieron la actividad utilizando un ensayo de proteasa con N-succinil-L-Ala-L-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). El ensayo está basado en la escisión por proteasas del enlace amida entre la fenilalanina y la *p*-nitroanilina del reactivo N-succinílico. La *p*-nitroanilina es monitorizada espectrofotométricamente a 410 nm y la velocidad de la aparición de *p*-nitroanilina es una medida de la actividad proteolítica. Una unidad de proteasa se define como la cantidad de enzima proteasa que aumenta la absorbancia a 410 nm en una unidad de absorbancia (UA)/min de una disolución patrón de suc-AAPF-pNA 1,6 mM en Amortiguador Tris 0,1 M a 25°C en una cubeta con una longitud de camino óptico de 1 cm. El glicerol se obtuvo en JT Baker.

ES 2 329 874 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para estabilizar una o más enzimas proteasas de especies de *Bacillus* en un medio líquido, que consiste en:
- formular en dicho medio líquido una sal de haluro de metal alcalino a un nivel de al menos 4% en peso en combinación con un disolvente de poliol a un nivel de al menos 30% en peso.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha sal de haluro de metal alcalino comprende cloruro de sodio, estando presente dicho cloruro de sodio a un nivel de al menos 4% en peso.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cloruro de sodio está presente a un nivel de entre 5% en peso y 12% en peso.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho poliol está presente a un nivel de al menos 50% en peso.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho poliol está presente a un nivel de entre 50% en peso y 80% en peso.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho disolvente de poliol se selecciona del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol, sacarosa y cualquier combinación de los mismos.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha una o más enzimas proteasas es una subtilisina.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, en el que dicho medio líquido es un concentrado líquido de enzimas o un producto formulado.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho medio líquido es un producto formulado seleccionado del grupo que consiste en productos para el cuidado personal, productos para el cuidado de la salud, productos de limpieza y productos de detergencia.
- 30 10. Una formulación líquida de enzimas estabilizada, que consiste en una o más proteasas de una especie de *Bacillus*, al menos 4% en peso de una sal de haluro de metal alcalino, y al menos 30% en peso de un disolvente de poliol en un medio líquido.
- 35 11. La formulación de la reivindicación 10, en la que dicha sal de metal alcalino comprende cloruro de sodio, estando presente dicho cloruro de sodio a un nivel de al menos 4% en peso.
- 40 12. La formulación de la reivindicación 11, en la que dicho cloruro de sodio está presente a un nivel de entre 5% en peso y 12% en peso.
13. La formulación de la reivindicación 10, en la que dicho poliol está presente a un nivel de al menos 50% en peso.
- 45 14. La formulación de la reivindicación 13, en la que dicho poliol está presente a un nivel de entre 50% en peso y 80% en peso.
- 50 15. La formulación de la reivindicación 10, en la que dicho disolvente de poliol se selecciona del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol, sacarosa y cualquier combinación de los mismos.
16. La formulación de la reivindicación 10, en la que dichas una o más enzimas proteasas incluyen una subtilisina.
- 55 17. La formulación de la reivindicación 16, en la que dicha subtilisina tiene al menos 98% de actividad remanente después de 22 días a 37°C.
18. La formulación de la reivindicación 16, en la que dicha subtilisina incluye una substitución de aminoácidos en la posición 217.
- 60 19. La formulación de la reivindicación 10, en la que dicha formulación líquida es un concentrado líquido de enzimas o un producto formulado.
- 65 20. La formulación de la reivindicación 19, en la que dicha formulación líquida es un producto formulado seleccionado del grupo que consiste en productos para el cuidado personal, productos para el cuidado de la salud, productos de limpieza y productos de detergencia.