



RG

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

10-154340

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-154340- -00000-0000

Fecha: 2010-12-07 17:03:46

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 185

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO RECUPERACIÓN DE ENZIMA INSOLUBLE DE CALDO
DE FERMENTACIÓN Y FORMULACIÓN DE ENZIMA INSOLUBLE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE DANISCO US INC.

DOMICILIO 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, E. U. A.

74. APODERADO JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETITORIO																		
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-154340-00000-0000 Fecha: 2010-12-07 17:03:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 185	de radicación																
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL																		
① SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad																		
☒ Capítulo I ☐ Capítulo II																		
②	SOLICITANTE Nombre: DANISCO US INC. Dirección: 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, Estados Unidos de America Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense Lugar de Constitución: Delaware Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN ☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cuál _____ Número _____																
③	REPRESENTANTE O APODERADO Nombre: JERÓNIMO CASTILLO BONILLA Dirección: Calle 93A No. 14-17 Oficina 311 Bogotá, D.C. Teléfono: 236 34 93 Fax: 218 23 51 E-mail: info@pcastillopineda.com	IDENTIFICACIÓN ☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cuál _____ Número 79.462.057 TP 104167																
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder). _____																		
④	INVENTOR (ES) (72) Nombre: Michael BODO Dirección: 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, Estados Unidos de America Nacionalidad o Domicilio: Austriaco																	
⑤	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2009/046783</u> Fecha <u>Junio 9, 2009</u> Publicación internacional No. <u>WO 2009/152176 A2</u> Fecha <u>Dic 17, 2009</u>																	
⑥	Título (54) <u>RECUPERACION DE ENZIMA INSOLUBLE DE CALDO DE FERMENTACION Y FORMULACION DE ENZIMA INSOLUBLE</u>																	
⑦	Clasificación internacional (51)																	
⑧	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">(33) País de Origen</th> <th style="width: 30%;">(32) Fecha</th> <th style="width: 40%;">(31) Número de Solicitud</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">US</td> <td style="text-align: center;">Junio 9, 2008</td> <td style="text-align: center;">61/060.087</td> </tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>			(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	US	Junio 9, 2008	61/060.087									
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud																
US	Junio 9, 2008	61/060.087																
Prioridad ☒ SI ☐ NO																		
⑨	Comprobante de pago No. _____ Fecha _____																	

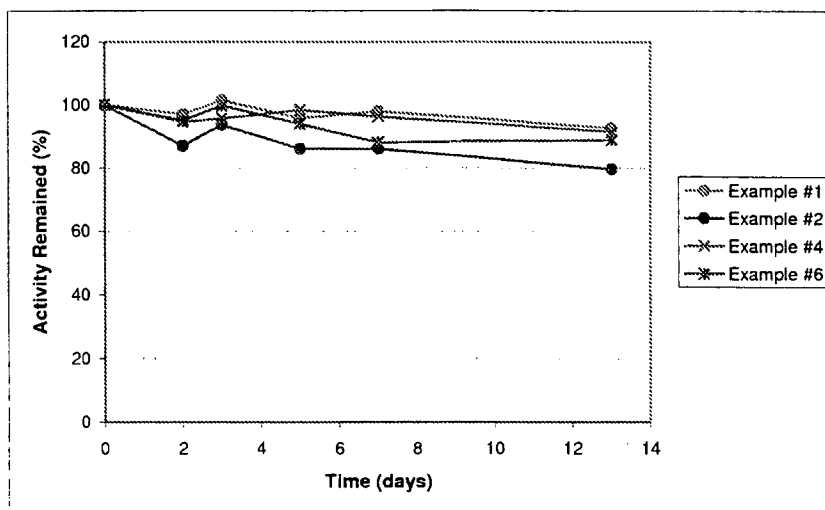
10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros - **Publicación Internacional, Copia de la oficina internacional mostrando que los solicitantes originales se modificaron para sólo DANISCO US INC.**

11

FIGURA CARACTERISTICA:

FIGURE 2



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE JERONIMO CASTILLO BONILLA

FIRMA

C.C. 79.462.057 Bogotá

TP 104167

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(Continuación Inventores)

Nombre : Robert I. CHRISTENSEN
Dirección : 925 Page Mill Road, Palo Alto, Estados Unidos de América.
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Rajdeep S. DHALIWALL
Dirección : 925 Page Mill Road, Palo Alto, Estados Unidos de América.
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Meng. H, HENG
Dirección : 925 Page Mill Road, Palo Alto, Estados Unidos de América.
Nacionalidad : Malasio

State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp

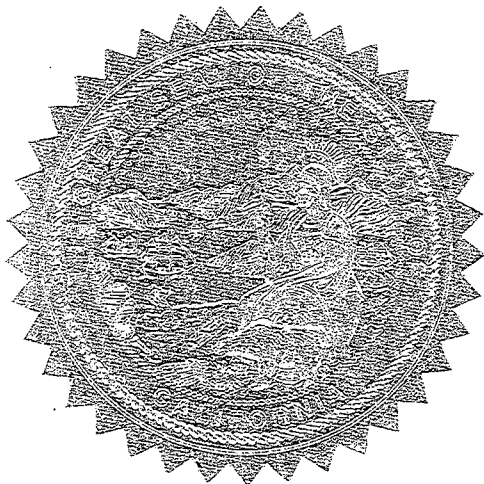
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

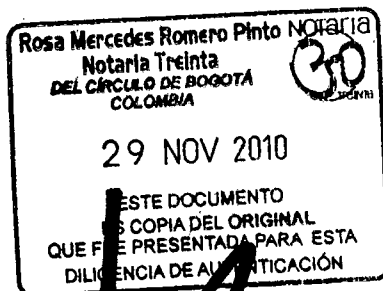
1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Carol A. See*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Carol A. See, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento California*
6. *the 1st day of September 2009*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 723031*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature



Secretary of State

BY

[Signature]



LAW OFFICES
PEDRO CASTILLO PINEDA &
ASSOCIATES
P.O. BOX 48362
Bogotá, Colombia / South America

IMPORTANT NOTE

The lodging of this GENERAL POWER with the Patent Office obviates the need of presenting special powers with each individual trade mark application.

FOR PATENTS AND TRADE MARKS IN
COLOMBIA

Poder General

General Power of Attorney

1 Applicant's name (1)

(1) Danisco US Inc.

2 Applicant's address domiciliado en (2)

domiciled in (2)
925 Page Mill Road, Palo Alto
California 94304
U.S.A.

nombra al Dr. JERONIMO CASTILLO BONILLA y/o Dra. XIMENA BONILLA PEREIRA y/o Dr. ALVARO CASTILLO GRAU Calle 93A N° 14-17 Oficina 311 en Bogotá, Colombia, como sus representantes con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Modelos y de Dibujos Industriales, de Nombres Comerciales y Enseñas, Lemas Comerciales y Denominaciones de Origen, lo mismo que trasposos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, cancelación de Registros de marca, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares; solicitar la nulidad de Patentes de Invención, modelos de utilidad, diseños industriales, así como la de registros de marcas ante la autoridad nacional competente; aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos, cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir y tomar en fin todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones y/o observaciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades necesarias, así como iniciar y tramitar procesos jurisdiccionales y/o administrativos relativos a competencia desleal. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, conciliar, renunciar, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.
Dado y firmado en (3)

hereby appoint, JERONIMO CASTILLO BONILLA and/or XIMENA BONILLA PEREIRA and/or ALVARO CASTILLO GRAU, Calle 93A N° 14-17 Office 311 en Bogotá, Colombia, as our representatives with special, ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Privileged Patents of invention, Registration of Trade Marks, of Models and Industrial Drawings, of Commercial Names and ensigns, Commercial slogans and Origin Denominations as well as assignments, extensions, renewals, changes of name, registration of license of exploitation and of license of use referred to said actions, Cancellation Actions against trademark Registrations, who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals, and claims, apply for precautionary measures; apply for the nullity of Patent Inventions, Utility Models, Industrial Designs, as well as for Trademark Registrations before the competent national authority; to accept on our behalf and representation the assignment of rights of inventions and titles of invention that may be done to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquittance or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case that oppositions and/or observations are presented to intervene as complainant and defendant, with all necessary legal faculties, as well as to file jurisdictional processes and/or administrative related to disloyal competition.

This power of attorney includes the faculties to receive, desist, compromise, transact substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to conciliate, to renounce, to receive notifications and to appoint extra-judicial or judicial attorneys.

3 Date
4 Applicant's signature

Given and signed in (3)
Palo Alto, California, U.S.A.
29th day of August, 2009

4) Signature (s)
X *Soonhee Jang*
Soonhee Jang



DECLARACION NOTARIAL
(Individual)

A los días del mes de
 compareció y/o comparecieron

personalmente ante mi, Notario Público

quien (es) doy fe de conocer y me consta que es
(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s) del
documento que precede, declarando ante mi que
otorga(n) el mismo para los fines y propósitos que
en él se expresan.

Notario Público,

.....

(Sociedades)

El suscrito Notario Certifica: que la firma que
antecede y dice

es auténtica; que el signatario desempeña
actualmente el cargo de

de,

que tiene facultad para otorgar este poder; y que
dicha compañía esta domiciliada en

y actualmente existe y esta organizada de acuerdo
a las leyes de

Todos los hechos anteriores le constan por haber
examinado los documentos respectivos y de todo
ello da fe.

Dado y firmado en

El Notario Público,

.....

(Con legalización Consular)

NOTARIAL CERTIFICATE
(Individual)

On this day of of
personally appeared before me

a Notary Public

to me known, and known to me to be the
person(s) described in and who executed the
foregoing document, and he (they) duly
acknowledged to me that he (they) executed
same for the uses and purposes therein expressed.

.....

Notary Public.

(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies: that the
preceding signature reading
Soonhee Jang

is authentic; that the signer at present fills the post
of Vice President, IP Strategy & Chief IP Counsel

of Danisco US Inc.

and that she is empowered to grant this power; and
that said company is domiciled in
Palo Alto, California, U.S.A.

and actually exists and is organized in accordance
with the laws of Delaware, USA

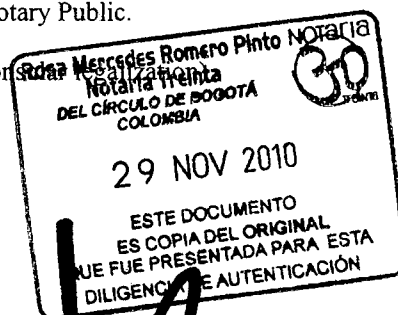
All the foregoing facts are known to the Notary
due to her having examined the respective
documents to which she, the Notary attests..

Given and signed in Palo Alto, California, USA
Carol A. See, Notary Public

Carol A. See
.....

Notary Public.

(With Consular



IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows:

Date: August 27, 2009

Soonhee Jang
Soonhee Jang,
Vice President, IP Strategy &
Chief IP Counsel

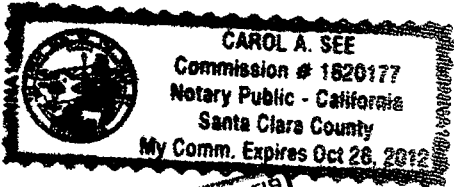
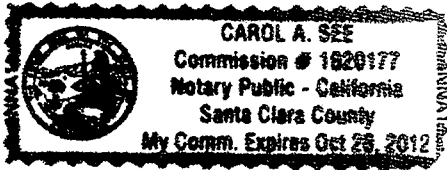
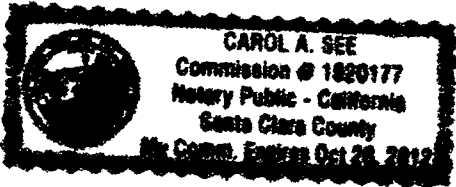
STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SANTA CLARA

On 8/27/09, before me, Carol A. See, Notary Public, personally appeared, Soonhee Jang, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument. I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Carol A. See

(Seal)



RECUPERACIÓN DE ENZIMA INSOLUBLE DE CALDO DE FERMENTACIÓN Y FORMULACIÓN DE ENZIMA INSOLUBLE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[01] Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/060,087, presentada el 9 de junio de 2008, la cual se incorpora por referencia en esta especificación en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[02] La invención se refiere a métodos para recuperar una o más enzimas de interés de un caldo de fermentación microbiano en la presencia de células microbianas o residuos celulares, y a formulaciones sólidas y líquidas, preparadas de una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares.

ARTE PREVIO

[03] La recuperación convencional de enzimas de caldo de fermentación microbiano para usos industriales en formas de productos líquidas o sólidas involucra normalmente varios pasos de procesamiento. La mayoría de los procesos de recuperación convencional incluyen cuatro pasos similares que ocurren secuencialmente: extracción del caldo microbiano de componentes insolubles, distintos del producto; aislamiento de productos; purificación; y acabado final. (Véase, v.g., *Enzymes in Industry: Production and Applications* (2007) Wolfgang Aehle, ed., 3rd edition, Wiley-VCH, página 49; *Bioseparations: Science and Engineering* (2003) R.G. Harrison, P. Todd, S.R. Rudge, D.P. Petrides, Oxford University Press, página 32.) Por ejemplo, la recuperación y formulación de una enzima producida intracelularmente incluyen por lo general los siguientes pasos de procesamiento: (1) lisis de células; (2) pretratamiento; (3) separación de células; (4) concentración; y (5) formulación - (a) adición de químicos para estabilización del líquido, seguida por filtración de acabado final; o (b) adición de químicos para estabilización del sólidos, seguida por secamiento.

[04] La lisis de células libera la(s) enzima(s) de interés de las células rompiendo las paredes celulares. La lisis de células puede obtenerse contactando las células con una enzima que degrada las paredes celulares tal como lisozima, induciendo cambios en el ambiente de fermentación tales como alteración en el pH, temperatura, concentración del oxígeno disuelto, concentración de glucosa, concentración de sal, o concentración de otros aditivos para producir una lisis espontánea, por rompimiento mecánico de la pared celular, tal como homogeneización, o por una combinación de estos métodos. Para enzima expresada extracelularmente (secretada en el medio de cultivo), la lisis de células es opcional. (Véase, v.g., *Isolation and Purification of Proteins* (2003) R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson, ed., Marcell Dekker, Inc., páginas 1-27.)

[05] Un paso de separación de células se emplea después de la lisis de células para producir una solución clarificada que contiene la(s) enzima(s) de interés. Normalmente, la separación de células involucra centrifugación y/o filtración, para extraer residuos celulares y cualquier material insoluble producido durante y/o luego de la fermentación, y/o como resultado de la lisis de células. Métodos de centrifugación apropiados incluyen centrifugación de discos o decantador. Métodos de filtración apropiados incluyen filtración en vacío rotatoria, filtración a través de una prensa filtrante de placa y marco, o filtración a través de microfiltro de membrana.

[06] La separación de células usando centrifugación es a menudo un compromiso entre la claridad y el rendimiento. Constituye una práctica común usar centrifugación de alto rendimiento y extraer luego, mediante filtración de alto rendimiento, cantidades trazadoras de sólidos suspendidos en magnitudes suficientes para interferir pasos subsiguientes de procesamiento. La mayoría de los métodos de filtración en práctica hoy en día requieren el uso de auxiliares de procesamiento, tales como tierra de diatomeas, o similares, y carbón (Solicitud PCT No. WO01/87468) para conseguir eficiencia de separación. La tierra de diatomeas mejora el rendimiento del proceso de filtración y la claridad del filtrado.

[07] Normalmente se emplea un paso de pretratamiento antes de la separación física de células o residuos celulares del líquido que contiene la(s) enzima(s) de interés. Por lo general, separar residuos celulares sin el citado paso es anti-

económico e intensivo en tiempo debido al pequeño tamaño de partícula de los residuos y la naturaleza viscosa del caldo de fermentación lisado. A menudo, el pretratamiento incluye la introducción de floculante(s) en el caldo lisado o no lisado. Los polielectrólitos han recibido mucha atención como un método para mejorar la floculación celular en la extracción de células bacterianas del caldo de fermentación. Baran (1988) *Colloids Surf.* 31:259-264; Bautista y col. (1986) *Biotechnol. Lett.* 8:315-318; Chen and Berg (1993) *Chem. Eng. Sci.* 48:1775-1784; Cumming y col. (1996) *Biotechnol. Tech.* 4:55-60; Hustedt and Theelen (1989) *DeChema Biotechnology Conferences - VCH Verlagsgesellschaft* 3:1071-1075; Ramsden y col. (1998) *Biotechnol. Tech.* 12:599-603; Shan y col. (1996) / *Biotechnol.* 49:173-178.

[08] La floculación facilita la extracción de residuos celulares de la porción líquida que contiene la(s) enzima(s) de interés. Algunos floculantes comúnmente empleados incluyen polietilenimina, cloruro de polidialildimetil amonio, y copolímero de cloruro de metacrililoiloxetil trimetilamonio-acrilamida. La floculación de residuos celulares es un fenómeno basado en la carga, requiriendo una baja fuerza iónica para su efectividad. Como resultado, generalmente se requiere la dilución del caldo de fermentación por agua para flocular los residuos celulares.

[09] Dependiendo de la concentración y pureza del producto final deseado, el líquido clarificado que contiene la(s) enzima(s) de interés del paso de separación de las células puede satisfacer los requerimientos para formulación con el fin de producir el producto. Sin embargo, a menudo, se requiere un procesamiento adicional para aumentar la concentración de enzima antes de la formulación. La concentración implica la extracción de agua, lo cual se logra normalmente por ultrafiltración o evaporación para enzimas termoestables. Otros métodos para concentración incluyen precipitación, cristalización, y cromatografía. (Véase, v.g., Solicitud PCT No. WO 91/09941.) Éstas no son prácticas comunes para recuperación industrial de enzimas debido al costo involucrado.

[10] Como ya se describió, la recuperación convencional y formulación de enzimas incluye múltiples pasos. Cada paso adicionado a un proceso de fabricación disminuye el rendimiento total del proceso y agrega costos en la forma de energía, tiempo y mano de obra.

[11] Los avances en la tecnología de expresión se han traducido en la capacidad de obtener concentraciones de enzima relativamente altas (v.g., 10-100 g/l) en caldo de fermentación. En algunos casos, el nivel de expresión excede el límite de solubilidad de una enzima de interés, y la enzima está presente en una forma cristalina o precipitada al final de la fermentación. Cuando para recuperar la enzima del caldo de fermentación se usa un proceso de recuperación tradicional, como ya se describió, los precipitados de enzima se extraerán simultáneamente con residuos insolubles de células y otro material insoluble durante el paso de separación de células. Como resultado, el rendimiento de recuperación será bajo. Una solución propuesta a este problema incluye la adición de un poliol inmediatamente después de un paso de recuperación a una solución de enzima supersaturada para impedir su precipitación. (Patente Europea No. EP1417301). Sin embargo, el citado proceso exige costos adicionales de material y añade un paso extra al proceso de recuperación. Un método para recuperar enzima insoluble sin la adición de un poliol sería ventajoso.

[12] Gránulos que contienen enzima se incorporan en productos en varias industrias, incluyendo las industrias de detergentes, procesamiento de textiles, alimentos (v.g., panadería), forrajes para animales, y etanol combustible. Tales gránulos pueden prepararse por un número de tecnologías, incluyendo recubrimiento de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior, granulación de alta cizalladura, extrusión, esferonización, formación de partículas esféricas sólidas a partir de un líquido ("*prilling*"), y secamiento por aspersión.

[13] Tradicionalmente, tales gránulos que contienen enzima incluyen enzimas que están en forma soluble antes de la incorporación en los gránulos y, si se expresan en un hospedero microbiano, se purifican por lo menos parcialmente para extraer células microbianas y/o residuos celulares producidos de la lisis de las células.

[14] En los casos en los que enzima insoluble está presente en el caldo microbiano, se requiere la solubilización antes de la recuperación. En algunos casos, esto puede conseguirse fácilmente modificando el pH y/o la temperatura, o por adición de sales simples. En otros casos, es necesaria la adición de polioles o

azúcares. Posteriormente a la solubilización, puede realizarse la separación de células. La corriente clarificada resultante es generalmente demasiado diluída para usarse para formulación. Se usa un paso de concentración, normalmente por ultrafiltración. El azúcar que se agregó pasará libremente la membrana de ultrafiltración y se convertirá en una corriente de desecho. El concentrado resultante puede formularse generalmente en un producto líquido. Sin embargo, no siempre se adapta para granulación. Como resultado, es necesaria la extracción del azúcar antes de la granulación. Esto puede lograrse mediante diafiltración, con lo cual se genera más desecho. El impacto de este enfoque es un incremento significativo en costos tanto para productos líquidos como sólidos, en virtud de los pasos de procesamiento y disposición final de los desechos. Esta invención provee un modo alternativo de producir económicamente un producto a partir de tal caldo.

[15] Existe una necesidad de formulaciones granulares de enzima en las cuales la enzima esté en forma insoluble y en las cuales no se extraigan células y/o componentes insolubles de células.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

[16] La invención provee métodos para la recuperación de enzimas insolubles, y composiciones con contenido de enzimas insolubles recuperadas y formuladas, como se describe en esta especificación.

[17] En un aspecto, se provee un método para recuperar una enzima insoluble de un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares de células microbianas, método que comprende recuperar una enzima insoluble del caldo microbiano sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano. En una incorporación, se provee un método para recuperar una enzima insoluble de un caldo microbiano, método que comprende: (a) proveer un caldo microbiano que contiene células microbianas y una enzima, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano; y (b) recuperar enzima insoluble en el caldo microbiano sin extraer las

células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada, en donde la composición incluye células microbianas y/o residuos celulares. En algunas incorporaciones, la enzima insoluble es enzimáticamente activa (es decir, la enzima es catalíticamente activa en el estado sólido o tiene potencial catalítico y se vuelve catalíticamente activa cuando se solubiliza en un disolvente apropiado y bajo condiciones apropiadas para que ocurra catálisis).

[18] En algunas incorporaciones, el caldo microbiano se produce por un método seleccionado de: mezclar una enzima con un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares, en donde la enzima no se produce por las células microbianas y en donde la enzima es insoluble en el caldo microbiano o en donde la enzima es soluble en el caldo microbiano, y el método comprende además hacer insoluble por lo menos algo de la enzima por la adición de un precipitante; agregar un precipitante a un caldo microbiano que contiene una enzima soluble expresada por las células microbianas, haciendo así que por lo menos algo de la enzima se vuelva insoluble; y expresar una enzima en células microbianas en un medio de fermentación, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el medio de fermentación.

[19] En algunas incorporaciones, el recuperar incluye por lo menos una operación de recuperación seleccionada de acondicionamiento del caldo; lisis de células; homogeneización; diafiltración; y separación sólido-líquido. En algunas incorporaciones, el recuperar incluye dos o más operaciones de recuperación seleccionadas de acondicionamiento del caldo; lisis de células; homogeneización; diafiltración; y separación sólido-líquido, ejecutadas en cualquier orden.

[20] En algunas incorporaciones, recuperar enzima insoluble comprende extraer por lo menos parte de la fase líquida del caldo microbiano. En algunas incorporaciones, extraer por lo menos parte de la fase líquida del caldo microbiano comprende concentrar los sólidos del caldo microbiano. En algunas incorporaciones, concentrar el caldo microbiano comprende un proceso de filtración de membrana seleccionado de ultrafiltración, microfiltración, ósmosis inversa, y nanofiltración. En algunas incorporaciones, extraer por lo menos parte

de la fase líquida del caldo microbiano, v.g., concentrar el caldo microbiano, comprende un proceso seleccionado de filtración de tambor rotatorio en vacío, filtración de placa y marco, filtración de cinta continua, centrifugación, separación ciclónica, decantación, y evaporación.

[21] En algunas incorporaciones, recuperar enzima insoluble comprende diafiltración.

[22] En algunas incorporaciones, el caldo microbiano se produce haciendo crecer una célula microbiana, que expresa la enzima, en un medio de crecimiento bajo condiciones apropiadas para expresión de la enzima, en donde la enzima es insoluble bajo las condiciones de crecimiento. En otras incorporaciones, el caldo microbiano se produce haciendo crecer una célula microbiana, que expresa la enzima, en un medio de crecimiento bajo condiciones apropiadas para expresión de la enzima, en donde la enzima es soluble bajo las condiciones de crecimiento, y en donde se agrega un precipitante antes de recuperar la enzima para hacer insoluble por lo menos algo de la enzima en el caldo microbiano. En algunas incorporaciones, el precipitante se selecciona de ajuste de pH, ajuste de la temperatura, adición de sal, adición de ácido, adición de base, adición de por lo menos otra proteína, adición de amortiguador, y adición de polielectrólito, o una combinación de los anteriores. En una incorporación, enzima insoluble se produce agregando un precipitante a un caldo microbiano que contiene una enzima soluble, haciendo así insoluble por lo menos algo de la enzima en el caldo microbiano, en donde el precipitante se selecciona de ajuste de pH, ajuste de la temperatura, adición de sal, adición de ácido, adición de base, adición de por lo menos otra proteína, adición de amortiguador, y adición de polielectrólito, o una combinación de los anteriores.

[23] En algunas incorporaciones, la composición que contiene enzima insoluble recuperada incluye células microbianas intactas. En una incorporación, las células microbianas intactas son células microbianas vivas. En otra incorporación, las células microbianas intactas son células microbianas muertas. En otras incorporaciones, la composición que contiene enzima insoluble recuperada incluye células microbianas lisadas.

[24] En algunas incorporaciones en las cuales la enzima expresada es insoluble en el caldo microbiano, el método comprende romper membranas de células microbianas para producir un lisado de células microbianas, antes o después de la recuperación de enzima insoluble. En otras incorporaciones en las cuales la enzima expresada es soluble en el caldo microbiano, el método comprende romper membranas de células microbianas antes o después de la adición de un precipitante, antes de la recuperación de la enzima precipitada.

[25] En cierta incorporación, el caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares incluye un lisado de células microbianas, producido rompiendo membranas de células microbianas de células microbianas intactas.

[26] En algunas incorporaciones, romper membranas de células microbianas comprende contactar la célula con una enzima que es capaz de efectuar lisis de células microbianas. En una incorporación, la enzima que es capaz de efectuar lisis de células microbianas es una enzima lisozima. En otras incorporaciones, romper membranas de células microbianas comprende un proceso mecánico de rompimiento de la membrana celular, tal como homogeneización. En algunas incorporaciones, romper membranas de células microbianas comprende un proceso mecánico de cizalladura, por ejemplo, seleccionado de homogeneización; mezclado de alta cizalladura; extrusión a presión; y bombeo de alta cizalladura. En algunas incorporaciones, el método comprende además homogeneizar el lisado de células microbianas para producir un lisado homogeneizado de células microbianas antes o después de recuperar la enzima insoluble.

[27] En algunas incorporaciones, el método comprende además diafiltrar el lisado de células microbianas antes o después de recuperar enzima insoluble. En algunas incorporaciones, el método comprende además homogeneizar y diafiltrar el lisado de células microbianas antes o después de recuperar enzima insoluble.

[28] En algunas incorporaciones, las células microbianas son células bacterianas. En algunas incorporaciones, las células bacterianas son células *Bacillus*. En algunas incorporaciones, las células *Bacillus* son células *Bacillus*

subtilis o *Bacillus licheniformis*.

[29] En algunas incorporaciones, las células microbianas son células fúngicas. En algunas incorporaciones, las células fúngicas son células *Trichoderma*. En algunas incorporaciones, las células *Trichoderma* son células *Trichoderma reesei*.

[30] En algunas incorporaciones, por lo menos alrededor de cualquiera de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.

[31] En algunas incorporaciones de los métodos de recuperación, la pureza de la enzima insoluble se aumenta en por lo menos alrededor de 10%.

[32] En otro aspecto, la invención provee una composición producida de acuerdo con un método para recuperar una enzima insoluble de un caldo microbiano, como se describe en esta especificación, en donde la composición contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares. En una incorporación, la composición contiene además por lo menos un ingrediente de formulación.

[33] En otro aspecto, la invención provee un método para producir una solución de enzima líquida clarificada, método que comprende: (a) proveer una composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, por ejemplo, producida de acuerdo con un método para recuperar una enzima insoluble de un caldo microbiano, como se describe en esta especificación; (b) solubilizar por lo menos parte de la enzima insoluble agregando una o más sustancias que disuelven la enzima y/o cambiando las condiciones físicas, de modo que la enzima se disuelva por lo menos parcialmente, produciendo así una solución de enzima soluble; y) extraer los sólidos de la solución preparada en paso (b), produciendo así una solución de enzima líquida clarificada.

[34] En otro aspecto, la invención provee un método de elaborar un gránulo que contiene enzima, método que comprende producir un gránulo que contiene enzima, [gránulo] que incluye una composición que incluye enzima insoluble, v.g., enzima insoluble recuperada, y células microbianas y/o residuos celulares. En una

incorporación, el método comprende: (a) proveer una composición que contiene enzima insoluble, v.g., enzima insoluble recuperada, y células microbianas y/o residuos celulares; y (b) producir un gránulo que contiene enzima, [gránulo] que incluye enzima insoluble. En algunas incorporaciones, la composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta especificación para recuperación de una enzima insoluble de un caldo microbiano. En una incorporación, la composición que contiene la enzima y células microbianas y/o residuos celulares se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano. En algunas incorporaciones, la enzima es enzimáticamente activa en el gránulo (*es decir*, la enzima es catalíticamente activa en el estado sólido o tiene potencial catalítico y se vuelve catalíticamente activa cuando se solubiliza en un disolvente apropiado y bajo condiciones apropiadas para que ocurra catálisis).

[35] En una incorporación, el gránulo que contiene la enzima se produce en un procesador de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior. En algunas incorporaciones, el gránulo que contiene la enzima se produce por un proceso de granulación seleccionado de procesamiento de lecho fluidizado con aspersión superior; procesamiento con recubridor Wurster con aspersión inferior; granulación de alta cizalladura; extrusión; y recubrimiento en bombo.

[36] En una incorporación, el método comprende aplicar una capa que contiene enzima, [capa] que incluye la composición que incorpora la enzima insoluble, v.g., enzima insoluble recuperada, y células microbianas y/o residuos celulares, sobre un núcleo en el citado procesador de lecho fluido con aspersión superior. Opcionalmente, el método incluye aplicar una capa de sal entre el núcleo y la capa que contiene la enzima. En una incorporación, el método comprende además aplicar una capa, que contiene una sal de barrera, sobre la citada capa que contiene la enzima. En una incorporación, el método comprende además aplicar una capa recubridora externa, que contiene un polímero y/o pigmento, sobre la

citada capa de sal de barrera.

[37] En una incorporación, el método comprende aplicar una capa de sal de barrera y/o una o más capas recubridoras sobre un núcleo que contiene una enzima, el cual incluye enzima insoluble, v.g., enzima insoluble recuperada, y células microbianas y/o residuos celulares. En una incorporación, el núcleo que contiene una enzima, se produce por procesamiento de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior. En una incorporación, el núcleo que contiene una enzima se produce por granulación de alta cizalladura.

[38] En otro aspecto, la invención provee un gránulo, que contiene una enzima, constituido por: un núcleo; opcionalmente, una capa de sal aplicada sobre el núcleo; y una capa que contiene la enzima aplicada sobre el núcleo, en donde la citada capa que contiene la enzima aplicada sobre el núcleo o capa de sal, en donde la capa que contiene la enzima incluye una composición que incorpora enzima insoluble, v.g., enzima insoluble recuperada, y células microbianas y/o residuos celulares, producida de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta especificación. En algunas incorporaciones, la composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta especificación para recuperación de una enzima insoluble de un caldo microbiano. En una incorporación, la composición que contiene la enzima y células microbianas y/o residuos celulares se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano, que contiene células microbianas y/o residuos celulares, sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano. En algunas incorporaciones, la enzima es enzimáticamente activa en el gránulo (*es decir*, la enzima es catalíticamente activa en el estado sólido o tiene potencial catalítico y se vuelve catalíticamente activa cuando se solubiliza en un disolvente apropiado y bajo condiciones apropiadas para que ocurra catálisis).

[39] En una incorporación, el gránulo consta además de una capa de sal de barrera aplicada sobre la citada capa que contiene la enzima. En una

incorporación, el gránulo está constituido además por una capa recubridora externa aplicada sobre la citada capa de sal de barrera, en donde la citada capa recubridora externa contiene un polímero y/o pigmento.

[40] En otro aspecto, la invención provee un gránulo que contiene enzima, el cual consta de un núcleo, que contiene enzima, y una capa de sal de barrera y/o una o más capas recubridoras, que rodean el núcleo, en donde el núcleo está constituido por una composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares. En algunas incorporaciones, la composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta especificación para recuperación de una enzima insoluble de un caldo microbiano. En una incorporación, la composición que contiene la enzima y células microbianas y/o residuos celulares se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano, constituido por células microbianas y/o residuos celulares, sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano. En algunas incorporaciones, la enzima es enzimáticamente activa en el gránulo (*es decir*, la enzima es catalíticamente activa en el estado sólido o tiene potencial catalítico y se vuelve catalíticamente activa cuando se solubiliza en un disolvente apropiado y bajo condiciones apropiadas para que ocurra catálisis).

[41] En una incorporación, el núcleo que contiene enzima se produce por procesamiento de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior. En una incorporación, el núcleo que contiene enzima se produce por granulación de alta cizalladura.

[42] En otro aspecto, la invención provee composiciones constituidas por cualquiera de los gránulos que contienen enzima, descritos en esta especificación. En una incorporación, la composición es una composición detergente. En otra incorporación, la composición es una composición para procesamiento de textiles. En otra incorporación, la composición es una composición para forraje de animales. En otra incorporación, la composición es una composición alimenticia.

[43] En otro aspecto, la invención provee una formulación líquida que contiene enzima, [formulación] que incluye una composición que contiene una enzima insoluble, v.g., enzima insoluble recuperada, y células microbianas y/o residuos celulares. En algunas incorporaciones, la composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta especificación para recuperar una enzima insoluble. En una incorporación, la composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano. En algunas incorporaciones, la enzima es enzimáticamente activa en la formulación líquida (*es decir*, la enzima es catalíticamente activa o tiene potencial catalítico y se vuelve catalíticamente activa cuando se solubiliza en un disolvente apropiado y bajo condiciones apropiadas para que ocurra catálisis). En algunas incorporaciones, la formulación líquida que contiene la enzima comprende además uno o más ingredientes de formulación seleccionados de un poliol; una sal; un preservante; un tensoactivo; y un antioxidante. En algunas incorporaciones, la formulación líquida contiene además un poliol. En algunas incorporaciones, la formulación líquida contiene además una sal. En algunas incorporaciones, la formulación líquida contiene además un preservante. En algunas incorporaciones, la formulación líquida contiene además un tensoactivo.

[44] En otro aspecto, la invención provee un método para preparar una formulación líquida que contiene una enzima, método que comprende suspender una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, producida de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta especificación, en un líquido.

[45] En otro aspecto, la invención provee un método para preparar una formulación líquida que contiene una enzima, método que comprende: (a) proveer una composición que incorpora enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, producida de acuerdo con cualquiera de los métodos

descritos en esta especificación; (b) y solubilizar la enzima insoluble en la composición. En una incorporación, el método comprende además extraer células microbianas y/o residuos celulares después del paso (b) y antes del paso (c), produciendo así una formulación líquida clarificada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[46] Figura 1 muestra el rendimiento de actividad de la aplicación de lavado de gránulos que contienen enzima, preparados como se describe en el Ejemplo 4 después del almacenamiento en detergente, como se describe en el Ejemplo 13.

[47] Figura 2 muestra la estabilidad enzimática de gránulos preparados en los Ejemplos 1, 2, 4, y 6, después del almacenamiento en detergente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[48] La invención provee métodos para recuperar y formular enzimas insolubles de caldo de fermentación microbiano sin extraer células microbianas o residuos celulares insolubles lisados del caldo. La invención provee igualmente formulaciones granulares y líquidas que contienen enzimas insolubles y células microbianas y/o residuos celulares, por ejemplo, recuperadas de acuerdo con los métodos descritos en esta especificación.

[49] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, y bioquímica, las cuales se hallan dentro de la habilidad del arte. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook y col., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col., eds., 1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis y col., eds., 1994); y Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (Kriegler, 1990).

[50] A menos que se defina lo contrario en esta solicitud, todos los términos técnicos y científicos empleados aquí tienen el mismo significado que se entiende

comúnmente por una persona de habilidad ordinaria en el arte al cual pertenece esta invención. Singleton, y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second ed., John Wiley and Sons, New York (1994), y Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a una persona de habilidad un diccionario general de muchos de los términos empleados en esta invención. En la práctica o fase experimental de la presente invención pueden emplearse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta especificación.

[51] Los intervalos numéricos provistos aquí son inclusivos de los números que definen el intervalo.

[52] A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3', y las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente.

Definiciones

[53] Tal como se emplea en esta especificación, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y cualquier estructura tridimensional y de una sola hebra o hebras múltiples (v.g., de una sola hebra, de dos hebras, de triple hélice, etc.), que contienen deoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o análogos o formas modificadas de deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, incluyendo nucleótidos modificados o bases o sus análogos. Debido a que el código genético se degenera, puede usarse más de un codón para codificar un aminoácido particular, y la presente invención engloba polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos particular. Puede usarse cualquier tipo de nucleótido modificado o análogo de nucleótido, siempre que el polinucleótido conserve la funcionalidad deseada bajo condiciones de uso, incluyendo modificaciones que aumentan la resistencia de la nucleasa (v.g., deoxi, 2'-O-Me, fosforotioatos, etc.). Pueden incorporarse igualmente etiquetas para propósitos de detección o captura, por ejemplo, etiquetas radioactivas o no radioactivas o anclas, v.g., biotina. El término polinucleótido incluye asimismo ácidos nucleicos peptídicos (PNA - *peptide nucleic acids*). Los polinucleótidos pueden ser de origen natural u origen no natural. Los términos "polinucleótido" y

"ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente en esta especificación. Los polinucleótidos de la invención pueden contener RNA, DNA, o ambos, y/o formas modificadas y/o análogos de los anteriores. Una secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos conectores alternativos. Estos grupos conectores alternativos incluyen, pero no se limitan a, incorporaciones en donde fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los cuales cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C), que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. Los polinucleótidos pueden ser lineales o circulares o contener una combinación de porciones lineales y circulares.

[54] Tal como se emplea en esta especificación, "polipéptido" se refiere a cualquier composición constituida por aminoácidos y reconocida como una proteína por aquellas personas expertas en el arte. En esta especificación se emplea el código convencional de una letra o tres letras para residuos aminoácidos. Los términos "polipéptido" y "proteína" se emplean indistintamente en esta especificación para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede contener aminoácidos modificados, y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos engloban también un polímero aminoácido que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente etiquetador. Se incluyen asimismo en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en el arte.

[55] Tal como se emplea en esta especificación, un "vector" se refiere a una secuencia polinucleotídica diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de bacteriófagos, casetes y similares.

[56] Tal como se emplea en esta especificación, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

[57] Tal como se emplea en esta especificación, "vector de expresión" se refiere a un constructo de DNA que contiene una secuencia codificante de DNA (v.g., secuencia génica), que está operacionalmente enlazada a una o más secuencia(s) de control apropiada(s), capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante en un hospedero. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión apropiados de mRNA ribosómico, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de bacteriófago, o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedero apropiado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma hospedero, o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma mismo. El plásmido es la forma más comúnmente usada de vector de expresión. No obstante, la invención pretende incluir aquellas otras formas de vectores de expresión que sirven funciones equivalentes y que son, o se vuelven, conocidas en el arte.

[58] Un "promotor" se refiere a una secuencia reguladora que está involucrada en unir RNA polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Un ejemplo no limitante de un promotor inducible que puede usarse en la invención es *Trichoderma reesei* cbhl, el cual es un promotor inducible.

[59] El término "enlazado operacionalmente" se refiere a juxtaposición, en donde los elementos están en un arreglo que les permite relacionarse funcionalmente. Por ejemplo, un promotor está enlazado operacionalmente a una secuencia codificante si él controla la transcripción de la secuencia codificante.

[60] "Bajo control transcripcional" es un término bien entendido en el arte, que

indica que la transcripción de una secuencia polinucleotídica depende de estar enlazada operacionalmente a un elemento que contribuye a la iniciación de, o promueve, la transcripción.

[61] "Bajo control traduccional" es un término bien entendido en el arte, el cual indica un proceso regulador que ocurre después de que el mRNA se ha formado.

[62] Un "gen" se refiere a un segmento de DNA que está involucrado en producir un polipéptido e incluye regiones que preceden y siguen a las regiones codificantes, así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

[63] Tal como se emplea en esta especificación, el término "célula hospedera" se refiere a una célula o línea de células en la cual un vector de expresión recombinante para la producción de un polipéptido puede transfectarse para expresión del polipéptido. Las células hospederas incluyen progenie de una célula hospedera individual, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o complemento de DNA genómico total) a la célula progenitora original debido a mutación natural, accidental, o deliberada. Una célula hospedera incluye células transfectadas o transformadas *in vivo* con un vector de expresión. "Célula hospedera" se refiere tanto a células como a protoplastos creados de las células de una cepa fúngica filamentosa y, particularmente, una cepa *Trichoderma* sp.

[64] El término "recombinante", cuando se emplea en referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína, o la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se hallan en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que, de otro modo, se expresan anormalmente, se subexpresan, o no se expresan en absoluto.

[65] Una "secuencia señal" se refiere a una secuencia de aminoácidos ligada a la porción N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura

de la proteína de la célula. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal, la cual se escinde durante el proceso de secreción.

[66] El término "marcador selectivo" o "marcador seleccionable" se refiere a un gen capaz de expresión en una célula hospedera que permite la facilidad de selección de aquellos hospederos que contienen un ácido nucleico o vector introducido. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen pero no se limitan a sustancias antimicrobianas (v.g., higromicina, bleomicina, o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional, a la célula hospedera.

[67] El término "derivado de" engloba los términos "originado de," "obtenido de," "obtenible de," "aislado de," y "creado de."

[68] El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina (véase, Alexopoulos, C. J. (1962), *INTRODUCTORY MYCOLOGY*, Wiley, New York). Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, celulosa, y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente invención son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. El crecimiento vegetativo por hongos filamentosos es por elongación hifal, y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aerobio. Una célula progenitora fúngica filamentosa en esta especificación puede ser una célula de una especie de, pero no limitada a, *Trichoderma*, (v.g., *Trichoderma reesei* (clasificado previamente como *T. longibrachiatum* y conocido actualmente también como *Hypocrea jecorina*), *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*); *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (v.g., *Humicola insolens* y *Humicola grisea*); *Chrysosporium* sp. (v.g., *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (v.g., *A. oryzae*, *A. niger*, y *A. awamori*), *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., *Hypocrea* sp., y *Emericella* sp. (véase asimismo, Innis y col., (1985) *Sci.* 228:21-26).

[69] Tal como se emplea en esta especificación, el término "*Trichoderma*" o "*Trichoderma* sp." se refiere a cualquier género fúngico, clasificado previa o actualmente como *Trichoderma*.

[70] El término "cultivar" se refiere a hacer crecer una población de células microbianas bajo condiciones apropiadas de crecimiento, en un medio líquido o sólido.

[71] El término "heterólogo" en referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que no ocurre naturalmente en una célula hospedera. En algunas incorporaciones, la proteína es una proteína industrial comercialmente importante. Se pretende que el término englobe proteínas que son codificadas por genes de origen natural, genes mutados, y/o genes sintéticos. El término "homólogo" en referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que ocurre naturalmente en la célula hospedera.

[72] El término "introducido" en el contexto de insertar una secuencia de ácido nucleico en una célula incluye "transfección," "transformación," o "transducción" y se refiere a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota, en donde la secuencia de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (v.g., cromosoma, plásmido, plastidio, o DNA mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo, o expresarse transitoriamente.

[73] Tal como se emplea en esta especificación, los términos "transformado," "transformado establemente," y "transgénico" se refieren a una célula que tiene una secuencia de ácido nucleico no nativo (v.g., heterólogo), integrado en su genoma, o como un plásmido episomal que se mantiene a través de múltiples generaciones.

[74] Los términos "aislado," y "separado", tal como se emplean en esta especificación, se refieren a un material (v.g., una proteína, ácido nucleico, o célula) que se extrae de por lo menos un componente con el cual está asociado naturalmente. Por ejemplo, estos términos pueden referirse a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan, como se encuentra en su estado nativo, tales como, por ejemplo, un sistema biológico intacto.

[75] El término "recuperado", tal como se emplea en esta especificación, se

refiere a una separación por lo menos parcial de una enzima de uno o más componentes solubles de un caldo microbiano y/o separación por lo menos parcial de uno o más disolventes en el caldo, *v.g.*, agua o etanol. Una enzima recuperada es a menudo de pureza más alta que antes del proceso de recuperación. No obstante, en algunas incorporaciones, una enzima recuperada puede ser de la misma pureza, o menor, que antes del proceso de recuperación.

[76] El término "proteína secretada" se refiere a una región de un polipéptido que se libera de una célula. En algunas incorporaciones, la proteína secretada es la proteína que se libera o escinde de un polipéptido de fusión recombinante.

[77] El término "secreción" se refiere al movimiento selectivo de una proteína a través de una membrana en una célula hospedera al espacio extracelular y el medio circundante.

[78] Tal como se emplea en esta especificación, el término "actividad específica" significa una unidad de enzima definida como el número de moles de sustrato convertidas a producto por una preparación de enzimas por unidad de tiempo bajo condiciones específicas. La actividad específica se expresa como unidades (U)/mg de proteína.

[79] Tal como se emplea en esta especificación, los términos "composición detergente" y "formulación detergente" se usan en referencia a mezclas que se destinan para uso en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas incorporaciones preferidas, el término se usa en referencia a lavar telas y/o prendas (*v.g.*, "detergentes de lavandería"). En incorporaciones alternativas, el término se refiere a otros detergentes, tales como los usados para limpiar platos, cubiertos, etc. (*v.g.*, "detergentes para lavar platos"). No se pretende que la presente invención se limite a alguna formulación detergente particular o composición. Por supuesto, se pretende que, además de la enzima, el término englobe detergentes que contienen tensoactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, óxido reductasas, mejoradores de detergente, agentes blanqueadores, activadores de blanqueado, agentes azulantes y colorantes fluorescentes, inhibidores de formación de grumos, agentes enmascarantes, activadores de enzimas, antioxidantes, y solubilizantes.

[80] Tal como se emplea en esta especificación, el término "desinfectar" se refiere a la extracción de contaminantes de las superficies, así como a la inhibición o eliminación de microbios en las superficies de artículos. No se pretende que la presente invención se limite a alguna superficie particular, artículo, o contaminante(s) o microbios a eliminar.

[81] "Caldo microbiano" o "caldo de fermentación" se refiere a un medio de crecimiento en el que se hacen crecer células microbianas (v.g., bacterianas o fúngicas) y el cual es apropiado para expresión de una enzima, como se describe en esta especificación.

[82] Una "enzima insoluble" se refiere a una enzima que está presente en una fase sólida. Una enzima insoluble se separa (*es decir*, se fracciona) con una fase sólida luego de la separación de las fases líquida y sólida, por ejemplo, las fases líquida y sólida de un caldo microbiano. Se entiende que en un caldo microbiano entero alguna enzima se encontrará normalmente también en la fase soluble en el medio, además de la enzima insoluble, que es parte de la fase sólida. La enzima insoluble puede estar unida a sólidos en el caldo microbiano, tales como sólidos celulares u otros componentes sólidos, o puede precipitarse o cristalizarse en el caldo microbiano.

[83] "Solubilización" o "solubilizar", tal como se emplea en esta especificación, se refiere a la eliminación de condiciones o sustancias que causan la precipitación de una enzima, o mantienen la enzima en una forma insoluble, o al cambio de las condiciones físicas (por ejemplo, cambio en temperatura; mezclado; sonicación) o adición de sustancias de solubilización (por ejemplo, disolventes de solubilización, v.g., agua; polioles; sales; ácidos; bases; tensoactivos) que vuelven soluble la enzima insoluble.

[84] "Purificar" o "purificación de" una enzima insoluble se refiere al refinamiento de una enzima de interés extrayendo parcial o completamente componentes que no son de interés, por ejemplo, componentes líquidos de un caldo microbiano que no son de interés. Una composición, que contiene enzima purificada, incluye una cantidad menor de uno o más componentes que la mezcla

de la cual se purificó la enzima.

[85] La "pureza" de la enzima en una mezcla puede calcularse dividiendo la actividad de la enzima por la cantidad total de sólidos secos. Los sólidos secos son una medida de todos los materiales presentes luego de que se ha extraído el líquido. Los sólidos secos pueden incluir, *inter alia*, proteína, sal, carbohidrato, metabolitos, ácido nucleico, lípidos, células, residuos celulares, y medio de fermentación agotado. La pureza de la enzima puede expresarse como un índice en relación con uno o más de los componentes de los sólidos secos.

[86] "Residuos celulares" se refieren a paredes celulares y otros componentes celulares insolubles que se liberan luego del rompimiento de la membrana celular, *es decir*, después de la lisis de células microbianas.

[87] "Acondicionamiento del caldo" se refiere a pretratamiento de un caldo de fermentación microbiano, diseñado para mejorar propiedades de manipulación posterior del caldo. El acondicionamiento del caldo cambia la composición química y/o las propiedades físicas y/o reológicas del caldo, para facilitar su uso en la recuperación *downstream* y/o procesos de formulación. El acondicionamiento del caldo puede incluir uno o más tratamientos tales como modificación de pH, tratamiento térmico, enfriamiento, adición de aditivos (v.g., calcio, sal(es), floculante(s), agente(s) redactor(es), activador(es) de enzimas, inhibidor(es) de enzimas, y/o tensoactivo (s)), mezclado, y/o mantenimiento programado (v.g., 0.5 a 200 horas) del caldo sin tratamiento adicional.

[88] "ATCC" se refiere a American Type Culture Collection, localizada en Manassas, Va. 20108 (www.atcc.org).

[89] "NRRL" se refiere a la Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research (y conocida previamente como USDA Northern Regional Research Laboratory), Peoria, Ill.

[90] "Un," "uno" y "el/la" incluyen referencias del plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Métodos de Recuperación

[91] La invención provee un método para recuperar una enzima insoluble de un caldo microbiano (*es decir*, un medio de fermentación microbiano, en el cual se han hecho crecer células que expresan la enzima), sin extracción de células o residuos celulares del caldo. La recuperación de la enzima insoluble incluye separar la enzima insoluble, en forma parcial o sustancial, completamente de los componentes solubles del caldo microbiano, *es decir*, separar la enzima insoluble de por lo menos una porción de los componentes solubles del caldo microbiano. Los procesos de recuperación descritos en esta especificación convierten el caldo de fermentación, que contiene una o más enzimas insolubles de interés, en enzima(s) recuperada(s) de interés, que pueden formularse para uso sin extracción de células o residuos celulares.

[92] En una incorporación, el método incluye proveer un caldo microbiano en el cual se han hecho crecer células microbianas que expresan la enzima, y en el que por lo menos algo de la enzima es insoluble, y recuperar la enzima insoluble sin extraer las células, produciendo así una composición que incluye enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares. En otra incorporación, la enzima expresada es soluble en el caldo microbiano, y por lo menos algo de la enzima se hace insoluble por adición de uno o más precipitante(s). En otra incorporación, la enzima no se expresa por las células microbianas, sino se agrega a un caldo microbiano en el cual se han hecho crecer células microbianas. La enzima agregada al caldo microbiano puede ser insoluble, o puede ser soluble y hacerse insoluble por adición de uno o más precipitante(s). Las células microbianas pueden lisarse antes o después de la recuperación de la enzima insoluble, produciendo residuos celulares insolubles.

[93] En algunas incorporaciones, un caldo microbiano que contiene una enzima soluble o insoluble expresada, se combina con una composición que contiene una enzima soluble o insoluble producida externamente. Uno o más precipitante(s) se agrega(n) para hacer insoluble por lo menos una de las enzimas (la enzima expresada por las células microbianas, que produjo el caldo microbiano y/o la enzima que se agregó al caldo microbiano).

[94] En algunas incorporaciones, la enzima soluble puede recuperarse conjuntamente con la enzima insoluble, cuando por lo menos parte de la fase líquida se extrae del caldo microbiano.

[95] Generalmente, la enzima insoluble recuperada está presente como un cuerpo de inclusión.

[96] En algunas incorporaciones, se combinan dos o más caldos microbianos de fermentaciones microbianas separadas, y una o más enzimas insolubles se recupera(n) de los caldos microbianos combinados.

[97] En métodos de la invención, la enzima insoluble es enzimáticamente activa, *es decir*, capaz de catalizar una reacción enzimática. La enzima insoluble tiene potencial catalítico, *es decir*, la enzima es catalíticamente activa en forma insoluble y/o después de la solubilización en un disolvente y bajo condiciones apropiadas para que ocurra actividad catalítica. En una incorporación, la enzima insoluble es catalíticamente activa tanto en forma insoluble como después de la solubilización. En una incorporación, la enzima insoluble es inactiva en forma insoluble y se vuelve catalíticamente activa después de la solubilización.

[98] En varias incorporaciones, cualquiera de por lo menos alrededor de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10% de la enzima es insoluble en el caldo microbiano antes de la recuperación de la enzima insoluble. En algunas incorporaciones, la pureza de la enzima insoluble se incrementa en por lo menos alrededor de 10% después de la recuperación de la enzima insoluble.

[99] La recuperación de enzima insoluble en caldo microbiano, que contiene células microbianas y/o residuos celulares, puede incluir, por ejemplo, concentración y/o diafiltración. El caldo microbiano, que contiene enzima insoluble, puede concentrarse para extraer por lo menos parte de la porción soluble del caldo, aumentando así la concentración de la enzima insoluble en el caldo, por una o más técnicas que son bien conocidas en el arte, incluyendo pero no limitadas a, procesos de membrana (v.g., ultrafiltración, microfiltración, nanofiltración), centrifugación, y evaporación. Alternativamente, o en conjunción con la concentración, puede emplearse diafiltración para reemplazar por lo menos

parte de la porción soluble del caldo microbiano, normalmente usando un proceso de membrana para diafiltrar el caldo microbiano de agua.

[100] En métodos de la invención, se hacen crecer células microbianas en un medio de crecimiento bajo condiciones apropiadas para la expresión de una enzima de interés, produciendo así un caldo microbiano que contiene la enzima de interés. Por ejemplo, la enzima de interés puede expresarse en una célula hospedera de un vector de expresión. La enzima de interés puede secretarse en el medio de crecimiento, o puede expresarse intracelularmente y no secretarse.

[101] Una enzima que se secreta en el medio de crecimiento puede ser naturalmente insoluble en el medio de crecimiento bajo las condiciones empleadas para el crecimiento de las células, o puede inducirse la insolubilidad de la enzima agregando un precipitante antes de la recuperación de la enzima. Ejemplos de precipitantes incluyen, pero no se limitan a sales (v.g., NaCl, NaSO₄, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, concentración alrededor de 0.1 a alrededor de 50% (w/v)), polielectrólitos (v.g., alginato, carboximetilcelulosa, ácido poliacrílico, ácido tánico, polifosfatos), y alteración en la temperatura o pH, o una combinación de los anteriores. (Véase, v.g., *Isolation and Purification of Proteins* (2003) R. Hatti-Kaul y B. Mattiasson, ed., Marcel Dekker, Inc., páginas 225-275; *Bioseparations: Science and Engineering* (2003) R.G. Harrison, P. Todd, S.R. Rudge, D.P. Petrides, páginas 243-271; *Protein Purification: Principles and Practice* (1994) R.K. Scopes, Springer, páginas 71-101.; *Protein Purification Process Engineering* (1994) R.G. Harrison, ed., Marcel Dekker Inc., "Differential Precipitation of Proteins," páginas 115 -208.)

[102] Igualmente, enzimas solubles pueden hacerse insolubles por interacciones de afinidad, v.g., interacciones enzima-sustrato o interacciones enzima-inhibidor, por ejemplo, por contacto con una resina de afinidad.

[103] Una enzima, que se expresa intracelularmente y no se secreta, puede liberarse por lisis de las células. La enzima liberada puede ser naturalmente insoluble bajo condiciones en el medio de crecimiento en el cual se libera, o puede inducirse insolubilidad por adición de un precipitante antes de la recuperación de la enzima, como se describe más arriba.

[104] Células microbianas que pueden usarse para expresar una enzima de interés, como se describe en esta especificación, pueden ser eucariotas o procariotas, por ejemplo, un microorganismo fúngico o bacteriano. Ejemplos de microorganismos eucariotas que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, *Trichoderma* sp., *Hypocrea* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Hansenula* sp., y *Fusarium* sp. Ejemplos de microorganismos procariotas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Pantoea* sp., *Escherichia* sp., y *Pseudomonas* sp.

[105] Cualquier enzima que se exprese en una forma insoluble o que se exprese en forma soluble y pueda hacerse insoluble, por ejemplo por adición de un precipitante, puede recuperarse de acuerdo con los métodos descritos en esta especificación y, opcionalmente, formularse en una formulación líquida o granular, como se describe en esta especificación. En algunas incorporaciones, la enzima es una hidrolasa, por ejemplo, una proteasa (bacteriana (v.g., una subtilisina) o fúngica; ácida, neutra, o alcalina), una amilasa (α o β), una lipasa, o una celulasa. En algunas incorporaciones, la enzima es una subtilisina, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,760,025, Patente EP No. 130 756, o Solicitud PCT No. WO 91/06637. En algunas incorporaciones, la enzima es una α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459. En algunas incorporaciones, la enzima es una celulasa, por ejemplo, Multifect L250™ o Puradax™, disponibles comercialmente de Genencor, Division of Danisco US, Inc. En algunas incorporaciones, la enzima es una oxidasa, una oxigenasa, una transferasa, una deshidratasa, una reductasa, una hemicelulasa, una peroxidasa, una fosfolipasa, una esterasa, una cutinasa, una pectinasa, una queratinasa, una lipoxigenasa, una ligninasa, una pululanasa, una tannasa, una pentosanasa, una malanasa, una β -glucanasa, una arabinosidasa, una hialuronidasa, una condroitinasa, una laccasa, una catalasa, una isomerasa, una pectato liasa, o una mannanasa, o una combinación de las anteriores. En algunas incorporaciones, la enzima es una fitasa. En algunas incorporaciones, la enzima es una enzima perhidrolasa tal como, por ejemplo, una enzima como se describe en la Solicitud PCT No. WO 05/056782.

[106] En los métodos de recuperación descritos en esta especificación, se

produce una composición que incluye enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares. En algunas incorporaciones, la composición incluye células microbianas intactas. En una incorporación, las células microbianas intactas son células microbianas vivas. En una incorporación, las células microbianas intactas son células microbianas muertas. (Véase, v.g., la Patente de los Estados Unidos No. 5,801,034, que describe un método para eliminar células sin lisis, ajustando el pH de una mezcla de fermentación a un valor igual a, o menor que, alrededor de dos unidades de pH por debajo del pK_a del ácido orgánico compatible, usando un ácido mineral, y agregando una cantidad suficiente de un ácido orgánico compatible y/o una sal de ácido orgánico a la mezcla, para efectuar una eliminación sustancialmente completa de las células.)

[107] En algunas incorporaciones, la composición incluye células microbianas lisadas, es decir, residuos celulares producidos por lisis de las células microbianas. En una incorporación, el método incluye romper las membranas de células microbianas para producir un lisado de células microbianas antes de la recuperación de la proteína insoluble. En el caso de una enzima que es soluble en el caldo microbiano y para la cual se induce insolubilidad por la adición de uno o más precipitante(s), puede ocurrir rompimiento de las membranas de células microbianas antes o después de la adición del (de los) precipitante(s). En algunas incorporaciones, el rompimiento de las membranas de las células se lleva a cabo contactando las células con una enzima que es capaz de lisis de células microbianas, por ejemplo, una enzima lisozima. En una incorporación, células que se han lisado con una enzima, que es capaz de lisis de células microbianas, se homogeneizan posteriormente para producir un lisado homogeneizado de células microbianas. En otras incorporaciones, el rompimiento de las membranas de las células se logra por homogeneización mecánica.

[108] Una composición, que contiene enzima, que incluye una o más enzimas insolubles y células microbianas y/o residuos celulares, preparada como se describe en esta especificación, puede formularse en una formulación líquida o granular.

Formulaciones Granulares

[109] Gránulos de enzima estable, con bajo nivel de generación de polvo, pueden producirse de caldo microbiano que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares. En algunas incorporaciones, el caldo microbiano que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos de recuperación descritos más arriba. Gránulos de enzima pueden producirse por métodos que son bien conocidos en el arte, por ejemplo, en un recubridor de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior, en un recubridor Wurster con aspersión inferior, o por granulación en tambor (v.g., granulación de alta cizalladura) extrusión, o recubrimiento en bombo.

[110] La invención ofrece un método de elaborar un gránulo que contiene enzima, método que comprende proveer una composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, producida, por ejemplo, mediante un método de recuperación, como se describe más arriba, y producir un gránulo que contiene enzima, el cual incluye la composición, en donde la enzima insoluble en el gránulo es enzimáticamente activa, es *decir*, capaz de actividad enzimática, cuando se pone en contacto con un sustrato para la enzima bajo condiciones que son apropiadas para que ocurra actividad catalítica. La enzima es catalíticamente activa en forma insoluble y/o cuando se solubiliza en un disolvente, en la presencia de sustrato y bajo condiciones apropiadas para que ocurra catálisis enzimática, por ejemplo, en una aplicación para uso del gránulo que contiene la enzima. En una incorporación, la enzima es catalíticamente activa tanto en forma insoluble como después de la solubilización. En una incorporación, la enzima es catalíticamente inactiva en forma insoluble y se vuelve catalíticamente activa después de la solubilización.

[111] En una incorporación, el gránulo que contiene la enzima se produce en un procesador de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior. En una incorporación, una capa, que contiene la enzima, que incluye la composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, como se describe más arriba, se aplica sobre un núcleo en el procesador de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior. Opcionalmente, el gránulo puede

contener una capa de sal entre el núcleo y la capa que contiene la enzima. La sal puede seleccionarse de, por ejemplo, sulfato de sodio, citrato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio, y sulfato de amonio, o una mezcla de los anteriores. Una o más capas adicionales pueden aplicarse sobre la capa que contiene enzima. Por ejemplo, una capa de sal de barrera puede aplicarse sobre la capa que contiene enzima. En algunas incorporaciones, una o más capas recubridoras exteriores pueden aplicarse sobre la capa que contiene enzima, o sobre una capa de sal de barrera que se aplica sobre la capa que contiene enzima. Capa(s) recubridora(s) externa(s) puede(n) contener, por ejemplo, polímero (s) y/o pigmento(s).

[112] En algunas incorporaciones, una composición que contiene una enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, como se describe más arriba, se incorpora en un núcleo, y una o más capas se aplican sobre el núcleo que contiene enzima. Por ejemplo, una capa de sal de barrera puede aplicarse sobre el núcleo que contiene enzima. En algunas incorporaciones, una o más capas recubridoras externas puede(n) aplicarse sobre el núcleo que contiene enzima, o sobre una capa de sal de barrera que se aplica sobre el núcleo que contiene enzima. Capa(s) recubridora(s) externa(s) puede(n) contener, por ejemplo, polímero(s) y/o pigmento(s).

[113] En algunas incorporaciones, un gránulo que contiene una enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce por granulación en tambor, tal como granulación de alta cizalladura. Tal gránulo consta de un núcleo que contiene enzima (incluyendo la enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares) y una o más capas recubridoras sobre el núcleo. Tales capas recubridoras pueden incluir, pero no limitarse a, un polímero, v.g., polietilen glicol o alcohol polivinílico, un pigmento, tal como dióxido de titanio, o glicerol.

[114] Los gránulos de la invención pueden incluir igualmente componentes adicionales tales como, pero no limitados a, plastificantes, materiales de relleno, y lubricantes.

[115] La invención provee gránulos que contienen enzima, los cuales constan de un núcleo y una composición que contiene enzima, en una capa que rodea el

núcleo o incorporada en el núcleo y, opcionalmente, una o más capas adicionales. La composición, que contiene enzima, incorpora una enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares microbianos, por ejemplo, producida como se describe más arriba. La enzima insoluble es enzimáticamente activa en el gránulo, *es decir*, capaz de actividad enzimática cuando se contacta con un sustrato para la enzima bajo condiciones que son apropiadas para que ocurra actividad catalítica. Enzima soluble en una composición que contiene células microbianas y/o residuos celulares (v.g., caldo microbiano con enzima soluble y células y/o residuos celulares) puede formularse asimismo en una formulación granular, como se describe en esta especificación.

[116] Los gránulos de la invención exhiben bajo contenido de polvo, por ejemplo, menos de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 2, 1, o 0,5 mg/pad, medido por el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach. Los gránulos son estables cuando se almacenan bajo condiciones de humedad y temperatura ambientes, pero son solubles o dispersables al contacto con agua, de modo que liberan la enzima cuando se usan.

[117] Gránulos pequeños sin recubrimientos protectores generan una cantidad significativa de polvo durante las operaciones neumáticas de transporte y llenado, tanto en la planta de fabricación del gránulo de enzima, como en la planta de fabricación del cliente. El polvo puede ser un problema higiénico y un problema de fabricación, de modo que tiene que minimizarse tanto como sea posible. Se han desarrollado varios ensayos industriales para medir la resistencia mecánica al desgaste por rozamiento y formación de polvo de diferentes formulaciones de enzima granulares. Éstos incluyen el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach y el ensayo de decantación. El ensayo de Heubach somete partículas a fuerzas definidas de trituración y fluidización usando paletas rotatorias para hacer rodar bolas de acero a través de un lecho de gránulos contenidos en una cámara cilíndrica y difundiendo simultáneamente una corriente de aire a través del lecho para arrastrar ("*to strip off*") cualquier polvo que se genere. El polvo generado es extraído mediante vacío a través de un tubo y se deposita sobre una almohada filtrante fuera de la cámara de Heubach. El peso o componente activo del polvo recolectado se designa como polvo de Heubach. En el ensayo de decantación, los gránulos se ponen sobre una frita de vidrio en un tubo alto de vidrio y se fluidizan

con una corriente constante de aire seco durante un período fijo de tiempo. Una discusión de los principios, operación y limitaciones de los ensayos de polvo de Heubach y decantación puede encontrarse por ejemplo, en "Enzymes In Detergency" ed. Jan H. van Ee., Ch. 15, páginas. 310 - 312, (Marcel Dekker, Inc. New York (1997) y las referencias citadas allí. El ensayo de polvo de Heubach se describe igualmente en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,324,649, 5,879,920, y 7,108,821.

Núcleo

[118] El núcleo es el núcleo interno del gránulo. Núcleos apropiados para uso en la presente invención son preferiblemente de un material altamente hidratable (es decir, un material que es fácilmente dispersable o soluble en agua). El material del núcleo debe dispersarse en agua (desagregarse, cuando se hidrata) o solubilizarse en agua transformándose en una verdadera solución acuosa. Arcillas (bentonita, caolín), nonpareils (micropperlitas) y almidón de papa aglomerado se consideran dispersables. Nonpareils son partículas esféricas que constan de un cristal semilla, que se ha incorporado y redondeado en una forma esférica uniendo capas de polvo y soluto al cristal semilla en un aparato recubridor. Los nonpareils se elaboran normalmente de una combinación de azúcar tales como sucrosa, y un polvo tal como almidón de maíz. Núcleos apropiados incluyen asimismo materiales de cristal semilla tales como cristales de sucrosa, semillas de cloruro de sodio o sulfato de sodio, y otras sales inorgánicas que pueden desarrollarse con sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y similares.

[119] Gránulos compuestos de sales orgánicas y/o azúcares y/o moléculas orgánicas pequeñas pueden usarse como los núcleos de la presente invención. Ingredientes solubles en agua, apropiados para incorporación en núcleos, incluyen: cloruro de sodio, sulfato de amonio, sulfato de sodio, urea, ácido cítrico, sucrosa, lactosa y similares. Ingredientes solubles en agua pueden combinarse con ingredientes dispersables en agua. Núcleos de la presente invención pueden contener además uno o más de los siguientes: ingredientes activos, polímeros, materiales de relleno, plastificantes, materiales fibrosos, extensores y otros compuestos conocidos por ser usados en núcleos. Polímeros apropiados incluyen – alcohol polivinílico (PVA - *poly vinyl alcohol*), polietilen glicol, óxido de polietileno,

y polivinil pirrolidina. El PVA puede ser PVA parcialmente hidrolizado (70 - 90%); intermedicamente hidrolizado (90 - 98%); completamente hidrolizado (98 - 99%); super hidrolizado (99 - 100%), o una mezcla de los anteriores, con un grado bajo a alto de viscosidad.

[120] El núcleo de un gránulo que contiene enzima, como se describe en esta especificación, puede estar constituido por una o más sales inorgánicas o un cristal de sucrosa. En algunas incorporaciones, el núcleo consiste de sulfato de sodio, citrato de sodio, cloruro de sodio, sulfato de calcio, o una combinación de los anteriores. En una incorporación, el núcleo está constituido por sulfato de sodio.

[121] Materiales de relleno apropiados, útiles en los núcleos, incluyen materiales inertes usados para impartir volumen y reducir costos, o usados con el propósito de ajustar la actividad prevista de la enzima en el gránulo terminado. Ejemplos de tales materiales de relleno incluyen, pero no se limitan a, agentes solubles en agua tales como urea, sales, azúcares y agentes dispersables en agua, tales como arcillas, talco, silicatos, carboximetilcelulosa y almidones.

[122] Plastificantes apropiados, útiles en los núcleos de la presente invención, son disolventes no volátiles agregados a un polímero para reducir su temperatura de transición vítrea, disminuyendo en esa forma la fragilidad y mejorando la deformabilidad. Normalmente, los plastificantes son compuestos orgánicos de bajo peso molecular y son altamente específicos del polímero que se está plastificando. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, azúcares (tales como glucosa, fructosa y sucrosa), alcoholes de azúcar (tales como, sorbitol, xilitol y maltitol), polioles (alcoholes polihídricos por ejemplo, alcoholes con muchos grupos radicales hidroxilo tales como glicerol, etilen glicol, propilen glicol o polietilen glicol), compuestos orgánicos polares de bajo peso molecular, tales como urea, u otros plastificantes conocidos, tales como ftalato de dibutilo o dimetilo, o agua.

[123] Materiales fibrosos apropiados, útiles en los núcleos de la presente invención, incluyen materiales que tienen una elevada resistencia a la tracción y que pueden moldearse en filamentos finos con un diámetro de 1 a 50 micrones y una longitud igual a por lo menos cuatro diámetros. Materiales fibrosos típicos

incluyen, pero no se limitan a: celulosa, fibras de vidrio, fibras metálicas, fibras de caucho, azlon (fabricado de proteínas que ocurren naturalmente en maíz, cacahuetes y leche) y fibras poliméricas sintéticas. Las sintéticas incluyen Rayon®, Nylon®, acrílico, poliéster, olefina, Saran®, Spandex® y Vinal®. Normalmente las fibras de celulosa tienen una longitud promedio de fibra de 160 micrones con un diámetro de alrededor de 30 micrones.

[124] Los núcleos pueden fabricarse por una variedad de técnicas de granulación bien conocidas en el arte, que incluyen: cristalización, precipitación, recubrimiento en bombo, recubrimiento de lecho fluidizado, atomización rotatoria, extrusión, esferonización, granulación en tambor y aglomeración de alta cizalladura.

[125] En una incorporación de la presente invención, el núcleo es un nonpareil soluble o dispersable en agua (ya sea azúcar o sal, como se describe más arriba), que puede recubrirse opcionalmente además por, o desarrollarse del, cristal semilla (nonpareil) usando alcohol polivinílico (PVA), solo o en combinación con agentes anti-aglomerantes tales como dióxido de titanio, talco, o plastificantes tales como sucrosa o polioles. El nivel de PVA en el recubrimiento del nonpareil puede representar desde alrededor de 0,5% a 20% del peso del nonpareil recubierto.

[126] En general, el núcleo que incluye cualquier ingrediente activo, incorporado en él, es una particular sensible al impacto. No obstante, la invención no se limita por el tipo de núcleo, y numerosas patentes y publicaciones describen núcleos que pueden usarse en la invención, y se hace referencia a USP 5,879,920; USP 4,689,287 y WO 00/24877.

Enzimas

[127] Una o más enzimas insolubles pueden usarse en los gránulos de enzima estable, con baja generación de polvo, de la presente invención. Una composición, que contiene enzima, que incluye una o más enzimas insolubles y células microbianas y/o residuos celulares, preparada como se describe más arriba, se incorpora en los gránulos descritos en esta especificación.

[128] En algunas incorporaciones, la enzima es una hidrolasa, por ejemplo, una proteasa (bacteriana (v.g., una subtilisina) o fúngica; ácida, neutra, o alcalina), una amilasa (α o β), una lipasa, o una celulasa. En algunas incorporaciones, la enzima es una subtilisina, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,760,025, la Patente EP No. 130 756, o la Solicitud PCT No. WO 91/06637. En algunas incorporaciones, la enzima es una α -amilasa como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459. En algunas incorporaciones, la enzima es una celulasa, por ejemplo, Multifect L250™ o Puradax™, disponibles comercialmente de Genencor, Division of Danisco US, Inc. En algunas incorporaciones, la enzima es una oxidasa, una oxigenasa, una transferasa, una deshidratasa, una reductasa, una hemicelulasa, una peroxidasa, una fosfolipasa, una esterasa, una cutinasa, una pectinasa, una queratinasa, una lipoxigenasa, una ligninasa, una pululanasa, una tannasa, una pentosanasa, una malanasa, una β -glucanasa, una arabinosidasa, una hialuronidasa, una condroitinasa, una laccasa, una catalasa, una isomerasa, una pectato liasa, o una mannanasa, o una combinación de las anteriores. En algunas incorporaciones, la enzima es una fitasa. En algunas incorporaciones, la enzima es una enzima perhidrolasa, tal como, por ejemplo, una enzima como se describe en la Solicitud PCT No. WO 05/056782. En algunas incorporaciones, la enzima es capaz de hidrolizar un sustrato (v.g., una mancha).

[129] En un aspecto, una o más enzimas insolubles en una composición que contiene células microbianas y/o residuos celulares se incorporan en el núcleo del gránulo. En otro aspecto preferido una o más enzimas en una composición que contiene células microbianas y/o residuos celulares se estratifican alrededor de un núcleo. Cuando se estratifica alrededor del núcleo, la capa que incorpora la enzima puede incluir adicionalmente un aglutinante tal como un polímero, por ejemplo un polímero vinílico tal como alcohol polivinílico (PVA).

[130] Una capa que contiene la enzima puede incluir opcionalmente uno o más de otros componentes además de la composición que contiene enzima. Tales componentes no-enzima incluyen, pero no se limitan a, polímeros (v.g., alcohol polivinílico, polietlen glicol), azúcares (v.g., sucrosa, sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltodextrina), almidones (v.g., almidón de maíz, almidón de trigo,

almidón de yuca, almidón de papa, almidón modificado química o físicamente), dextrinas, agentes antiespumantes (v.g., polioles de poliéter tales como Foamblast 882 (Emerald Foam Control), Erol DF 204K (Ouvrie PMC), DG436 (ODG Industries, Inc.), KFO 880 (KABO Chemicals, Inc.)), alcoholes de azúcar (v.g., sorbitol, maltitol, lactitol, xilitol), tensoactivos (v.g., etoxilados de alcohol tales como Neodol 23-6.5 (Shell Chemical LP, Houston, TX) y Lutensol TO65 (BASF)), y agentes anti-redeposición (v.g., poliésteres de polietilen glicol tales como Repel-o-Tex SRP6 (Rhodia, Inc.), Texcare SRN-100 o SRN-170 (Clariant GmbH, Sorez-100(ISP Corp.)).

[131] Un "agente antiespumante" es un compuesto que se usa para prevenir o descomponer espuma. Éstos pueden denominarse igualmente inhibidores de espuma o agentes inhibidores de espuma o reductores de espuma. Estos compuestos son sustancias tensioactivas que disminuyen la elasticidad superficial de líquidos e impiden la formación de espuma metaestable. La espuma se descompone como resultado de la tendencia a alcanzar el equilibrio entre la elasticidad superficial del líquido y las sustancias tensioactivas. (Vardar-Sukan (1991) *Recent Adv. Biotechnol.* 113-146). Antiespumantes útiles en los gránulos descritos en esta especificación son generalmente apropiados para uso en un bioproceso. Agentes antiespumantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, grasas, aceites, ceras, ácidos alifáticos o ésteres, alcoholes, sulfatos, sulfonatos, ácidos grasos, jabones, compuestos de nitrógeno, fosfatos, poliglicoles, sulfuros, compuestos tio, siloxanos y compuestos halogenados e inorgánicos. (Ghildyal (1988) *Adv. Appl. Microbiol.* (1988) 33:173-222). En algunas incorporaciones, son útiles aceites, ácidos grasos, ésteres, poliglicoles y siloxanos. En algunas incorporaciones, el agente antiespumante es copolímero de óxido de etileno / óxido de propileno. En una incorporación, el copolímero de óxido de propileno tiene un peso molecular aproximado de 2.200 (v.g., disponible como Mazu™ de Mazer Chemicals, Inc.).

[132] Los gránulos de la invención pueden incluir entre 0,01% a 50% o 75% en peso de sólidos de enzima (enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, producida como se describe más arriba). En varias incorporaciones, un gránulo puede incluir cualquiera de por lo menos alrededor de 0,5, 5, 10, 20, 30 o 40% de sólidos de enzima en peso. Una capa que

incorpora los sólidos de enzima, incluyendo cualesquiera aglutinantes y otros componentes en ella, puede incluir entre alrededor de 0,2% a 70% o 80% en peso del gránulo.

[133] En algunas incorporaciones, una capa que contiene la enzima con una viscosidad de menos de 20 centipoise facilita la granulación libre de aglomeración.

Capas Recubridoras

[134] Los gránulos de la presente invención pueden contener asimismo una o más capas recubridoras. Las capas recubridoras pueden servir cualquiera de un número de funciones, dependiendo del uso final del gránulo. Por ejemplo, los recubrimientos pueden hacer el ingrediente activo, particularmente enzimas, resistentes a la oxidación por blanqueamiento, o las capas recubridoras pueden producir la tasa deseable de disolución luego de la introducción del gránulo en un medio acuoso, o proporcionar una barrera adicional contra la humedad ambiente, con el fin de mejorar la estabilidad de almacenamiento del gránulo y reducir la posibilidad de crecimiento microbiano en el gránulo.

[135] En una incorporación de la presente invención, la capa recubridora incorpora de uno o más polímero(s) y, opcionalmente, un pigmento con bajo contenido de residuos u otros excipientes tales como lubricantes. Tales excipientes son conocidos por los expertos en el arte. Más aún, pueden usarse agentes recubridores en conjunción con otros agentes activos de categorías idénticas o diferentes.

[136] Polímeros apropiados incluyen PVA y/o PVP o mezclas de los dos. Si se emplea PVA, puede ser PVA parcialmente hidrolizado, completamente hidrolizado o intermedicamente hidrolizado con grados bajos a altos de viscosidad (preferiblemente PVA parcialmente hidrolizado con baja viscosidad). Otros polímeros vinílicos que pueden ser útiles incluyen acetato de polivinilo y polivinil pirrolidona. Copolímeros útiles incluyen, por ejemplo, copolímero de PVA-metilmetakrilato. Otros polímeros tales como PEG pueden usarse asimismo en la capa externa. Estas capas recubridoras adicionales pueden contener uno o más

de los siguientes: plastificantes, pigmentos, lubricantes tales como tensoactivos o agentes antiestáticos y, opcionalmente, enzimas adicionales. Plastificantes adicionales útiles en las capas recubridoras de la presente invención son aquellos divulgados anteriormente en esta especificación. Pigmentos apropiados útiles en las capas recubridoras de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, blanqueadores finamente divididos tales como dióxido de titanio o carbonato de calcio, o pigmentos coloreados, o una combinación de los anteriores. Preferiblemente tales pigmentos son pigmentos con bajo contenido de residuos luego de la disolución.

[137] Tal como se emplea en esta especificación "lubricantes" significan cualquier agente que reduce la fricción superficial, lubrica la superficie del gránulo, disminuye la electricidad estática o reduce la friabilidad de los gránulos. Los lubricantes pueden jugar igualmente un papel relacionado en mejorar el proceso de recubrimiento, reduciendo la pegajosidad de los aglutinantes en el recubrimiento. Por consiguiente, los lubricantes pueden servir como agentes anti-aglomerantes y agentes humectantes.

[138] Agentes lubricantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, tensoactivos (iónicos, no iónicos o aniónicos), ácidos grasos, agentes antiestáticos y agentes inhibidores de la formación de polvo. Preferiblemente el lubricante es un tensoactivo y, muy preferiblemente, es un tensoactivo a base de alcohol tal como un alcohol primario, lineal, de una longitud de cadena de 9 a 15 átomos de carbono, un alcano o un alqueno o un etoxilado o derivado etoxisulfato de los anteriores. Tales tensoactivos se obtienen comercialmente como la línea de productos Neodol® de Shell International Petroleum Company. Otros lubricantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, agentes antiestáticos tales como StaticGuard™, Downey™, Triton X100 o 120 y similares, agentes inhibidores de la formación de polvo tales como Teflon™ y similares, u otros lubricantes conocidos por los expertos en el arte.

[139] Pueden incluirse otras capas intermedias, tales como aglutinantes, agentes estructurantes, y capas de barrera. Materiales de barrera apropiados incluyen, por ejemplo, sales inorgánicas, azúcares, o ácidos orgánicos o sales. Agentes estructurantes pueden ser polisacáridos o polipéptidos. Agentes estructurantes

preferidos incluyen almidón, almidón modificado, carragenina, celulosa, celulosa modificada, goma arábica, goma de guar, goma de acacia, goma xantana, goma de algarrobo, quitosana, gelatina, colágeno, caseína, ácido poliaspártico y ácido poliglutámico. Preferiblemente, el agente estructurante tiene baja alergenicidad. Una combinación de dos o más agentes estructurante puede utilizarse en los gránulos de la presente invención. Los aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, azúcares y alcoholes de azúcar. Azúcares apropiados incluyen, pero no se limitan a, sucrosa, glucosa, fructosa, rafinosa, trehalosa, lactosa y maltosa. Alcoholes de azúcar apropiados incluyen sorbitol, manitol e inositol.

Capa de Barrera

[140] En algunas incorporaciones, una capa de barrera se aplica sobre la capa de enzima, o sobre un núcleo que incorpora una enzima en un gránulo que contiene enzima, como se describe en esta especificación. En algunas incorporaciones, la capa de barrera contiene una o más sales, por ejemplo, sulfato de sodio, citrato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio, y/o sulfato de amonio. En algunas incorporaciones, la capa de barrera incluye, está constituida por, o consta esencialmente de sulfato de sodio. En algunas incorporaciones, la capa de barrera contiene un azúcar (v.g., sucrosa), un polisacárido (v.g., almidón), o una combinación de los anteriores.

[141] En algunas incorporaciones, la capa de barrera es hidratada. El término "hidratada" significa que el material de barrera contiene agua en una forma libre o ligada, o una combinación de las dos. El agua de hidratación puede agregarse durante o después del proceso de recubrimiento. El grado de hidratación será una función del material mismo y las condiciones de temperatura, humedad y secamiento bajo las cuales se aplica.

[142] Actividad de agua "moderada o alta" significa tener una actividad de agua de por lo menos alrededor de 0,25, 0,30, o 0,35. La actividad de agua mencionada en esta especificación es la del gránulo mismo una vez el material de barrera — pero no capas adicionales — se ha aplicado sobre él. Recubrimientos adicionales pueden enmascarar una medición exacta de la actividad de agua del material de barrera como una capa distinta.

[143] Sin pretender entrar en limitaciones teóricas, se espera que materiales con una actividad de agua mayor que 0,25 tendrán una fuerza impulsora reducida para absorber agua bajo condiciones de almacenamiento en las cuales la humedad relativa es mayor que 25%. La mayoría de los climas tienen humedades relativas superiores al 25%. Muchos detergentes tienen actividades de agua en el intervalo de alrededor de 0,3 a 0,4. Si la actividad de agua del gránulo es realmente mayor que la del detergente circundante o el clima de almacenamiento, la fuerza impulsora para la absorción de agua por el gránulo debe eliminarse y, de hecho, puede cederse agua por el gránulo a sus alrededores. Incluso si la actividad de agua del gránulo es menor que la del detergente, o la humedad relativa correspondiente, el agua presente en la capa de barrera actuaría como un escudo que limita la cantidad de agua que se absorbe por el gránulo y afecta el núcleo de la proteína.

[144] En el caso de hidratos de sal, el material hidratado es un hidrato de sal cristalina con aguas ligadas de cristalización. El hidrato debe elegirse y aplicarse en una manera tal que el gránulo recubierto resultante tenga una actividad de agua en exceso de 0,25, o tan alta como sea posible, manteniendo al mismo tiempo un gránulo que sea seco al tacto. Aplicando un hidrato de sal, o cualquier otro material de barrera hidratado apropiado, en tal manera, se elimina cualquier fuerza impulsora para absorción adicional de agua por el gránulo. Como una consecuencia importante, se elimina la fuerza impulsora para transporte de sustancias, que puedan ser perjudiciales a la actividad de la enzima, tal como perborato o un anión de peróxido. Sin agua como un vehículo, estas sustancias tienen menos tendencia a penetrar el núcleo de la enzima. Datos empíricos demuestran que la actividad de la enzima en el gránulo se mejora sustancialmente recubriendo el núcleo de la enzima con hidratos de sal estable.

[145] Ejemplos de sales apropiadas para la producción de una capa de barrera hidratada incluyen heptahidrato de sulfato de magnesio, heptahidrato de sulfato de zinc, pentahidrato de sulfato de cobre, heptahidrato dibásico de fosfato de sodio, heptahidrato de nitrato de magnesio, decahidrato de borato de sodio, dihidrato de citrato de sodio y tetrahidrato de acetato de magnesio.

Capa Recubridora Externa

[146] En algunas incorporaciones, un gránulo que contiene enzima incluye una capa recubridora externa. En una incorporación, la capa recubridora externa se aplica sobre la capa de enzima. En algunas incorporaciones, una capa recubridora externa se aplica sobre una o más capas recubridoras intermedias. En una incorporación, la capa recubridora externa se aplica sobre una capa de barrera, la cual se aplica sobre la capa de enzima o sobre un núcleo que contiene enzima.

[147] En algunas incorporaciones, la capa recubridora externa incluye uno o más polímeros. Polímeros apropiados incluyen, pero no se limitan a, alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona (PVP), acetato de polivinilo, copolímero de PVA-metilmacrilato, copolímero de PVP-PVA, derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxixelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polietilen glicol, óxido de polietileno, quitosana, goma arábica, xantana, carragenina, polímeros de látex, y polímero entérico.

[148] En algunas incorporaciones, la capa recubridora externa incluye PVA. PVAs apropiados para incorporación en la capa recubridora externa incluyen PVAs parcialmente hidrolizados, completamente hidrolizados, e intermedicamente hidrolizados con grados bajos a altos de viscosidad (véase, v.g., Patente de los Estados Unidos No. 5,324,649). En una incorporación, la capa recubridora externa incluye PVA parcialmente hidrolizado con baja viscosidad.

[149] En algunas incorporaciones, la capa recubridora externa incluye uno o más pigmentos. Ejemplos no limitantes de pigmentos apropiados incluyen blanqueadores finamente divididos, tales como dióxido de titanio o carbonato de calcio, sulfato de calcio, talco, o pigmentos coloreados o colorantes. Normalmente, tales pigmentos son pigmentos con bajo contenido de residuos luego de la disolución. Además de polímeros y/o pigmentos, la capa recubridora externa puede incluir asimismo uno o más plastificantes, extensores, lubricantes, tensoactivos, y agentes anti-redeposición.

[150] Plastificantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, polioles (v.g., azúcares, alcoholes de azúcar, polietilen glicoles (PEGs), glicol, propilen glicol), urea, citrato de trietilo, ftalato de dibutilo o dimetilo, o agua.

[151] Extensores apropiados incluyen, pero no se limitan a, azúcares (v.g., sucrosa o hidrolizados de almidón, tales como maltodextrina o sólidos de jarabe de maíz), arcillas (v.g., caolín o bentonita), y talco. Un "extensor" es una sustancia (generalmente de menor costo) agregada a otra sustancia (generalmente de costo más alto y mayor rendimiento) para modificarla o diluirla.

[152] Lubricantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, tensoactivos no iónicos (v.g., Neodol, Lutensol TO 65), alcoholes de sebo, ácidos grasos, sales de ácidos grasos (v.g., estearato de magnesio), y ésteres de ácidos grasos.

[153] Tensoactivos apropiados incluyen, pero no se limitan a, etoxilados de alcohol tales como Neodol 23-6.5 y Lutensol TO65.

[154] Agentes anti-redeposición apropiados incluyen, pero no se limitan a, poliésteres de polietilen glicol tales como Repel-o-Tex SRP6, Texcare SRN-100 o SRN-170, y Sorex-100.

Otros Ingredientes Auxiliares

[155] Ingredientes auxiliares pueden agregarse a los gránulos de la presente invención, incluyendo, mas no limitados a: sales metálicas, solubilizantes, activadores, antioxidantes, colorantes, inhibidores, aglutinantes, fragancias, agentes protectores de enzima/secuestrantes tales como sulfato de amonio, citrato de amonio, urea, clorhidrato de guanidina, carbonato de guanidina, sulfonato de guanidina, dióxido de tiourea, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, aminoácidos tales como glicina, glutamato de sodio y similares, proteínas tales como albúmina sérica bovina, caseína y similares, etc., tensoactivos, incluyendo tensoactivos aniónicos, tensoactivos anfotéricos, tensoactivos no iónicos, tensoactivos catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga, mejoradores de detergente, álcalis o electrólitos inorgánicos, agentes blanqueadores, agentes azulantes y colorantes fluorescentes, e inhibidores de formación de grumos. Los

tensoactivos se describen, por ejemplo, en la Solicitud PCT/US92/00384, la cual se incorpora en esta especificación por referencia.

Gránulos de Matriz

[156] En una incorporación, el gránulo incluye una "matriz" de proteína que incluye la composición que contiene la enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares mezclada junto con una combinación de un azúcar o un alcohol de azúcar y un agente estructurante (véase, v.g., EP1037968B1). Opcionalmente, una capa de barrera puede aplicarse sobre la matriz que contiene enzima, o un material de barrera puede incluirse en la matriz que contiene enzima. Además, opcionalmente, puede aplicarse un recubrimiento sobre una partícula semilla, una matriz de enzima que rodea la partícula semilla, y/o la capa de barrera. En algunas incorporaciones, el agente estructurante es un polisacárido o un polipéptido. La matriz puede ser homogénea en todas partes del núcleo o puede recubrirse sobre una partícula. Puede haber una o más capas entre la partícula semilla y la matriz, o la matriz y la capa de barrera, por ejemplo, un recubrimiento tal como alcohol polivinílico (PVA). Puede producirse un gránulo de matriz, por ejemplo, en un procesador de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior.

[157] Partículas semilla son partículas inertes sobre las cuales puede recubrirse la matriz de enzima y pueden estar compuestas por sales inorgánicas, azúcares, alcoholes de azúcar, moléculas orgánicas pequeñas tales como ácidos orgánicos o sales, minerales tales como arcillas o silicatos o una combinación de uno o más de éstos. Ingredientes solubles apropiados para incorporación en partículas semilla incluyen: cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de amonio, sulfato de sodio, sesquicarbonato de sodio, urea, ácido cítrico, citrato, sorbitol, manitol, oleato, sucrosa, lactosa y similares. Ingredientes solubles pueden combinarse con ingredientes dispersables tales como talco, caolín o bentonita. Partículas semilla pueden fabricarse por una variedad de técnicas de granulación incluyendo: cristalización, precipitación, recubrimiento en bombo, recubrimiento de lecho fluidizado, aglomeración de lecho fluidizado, atomización rotatoria, extrusión, formación de partículas esféricas sólidas a partir de un líquido ("**prilling**"), esferonización, granulación en tambor y aglomeración de alta cizalladura. En los gránulos de la presente invención, si se usa una partícula semilla, entonces la

relación de partículas semilla a gránulos es 1:1.

[158] Azúcares apropiados incluyen azúcares tales como sucrosa, glucosa, fructosa, rafinosa, trehalosa, lactosa y maltosa. Alcoholes de azúcar apropiados incluyen sorbitol, mannitol e inositol. La relación de azúcar o alcohol de azúcar a agente estructurante en la matriz es preferiblemente 0,1-90% en peso de la matriz de proteína. El azúcar o alcohol de azúcar en la matriz puede ser azúcar o alcohol de azúcar agregado a la proteína, o puede ser del caldo de fermentación en el cual está presente la proteína.

[159] El agente estructurante puede ser un polisacárido o un polipéptido. Estas clases de compuestos tienen las propiedades simultáneas deseadas de alto peso molecular y alta solubilidad en agua. Sin pretender entrar en limitaciones teóricas, se cree que el alto peso molecular del agente estructurante contribuye a dos propiedades importantes de las que carecería una matriz de azúcar o alcohol de azúcar sola: (1) proporcionar cohesión y resistencia a la partícula, reduciendo en gran medida la tendencia de la partícula al polvo; y (2) servir como una barrera de difusión al agua y moléculas pequeñas en virtud de formar una red polimérica o "jaula" en toda la estructura de la matriz. Esto mejora en gran medida la estabilidad del gránulo.

[160] Agentes estructurantes preferidos incluyen almidón, almidón modificado, carragenina, celulosa, celulosa modificada, goma arábiga, goma de guar, goma de acacia, goma xantana, goma de algarrobo, quitosana, gelatina, colágeno, caseína, ácido poliaspártico y ácido poliglutámico. Preferiblemente, el agente estructurante tiene baja alergenicidad. Una combinación de dos o más agentes estructurantes puede usarse en los gránulos de la presente invención.

[161] La matriz que contiene enzima puede incorporar además uno o más polímeros sintéticos u otros excipientes, como son conocidos por los expertos en el arte. Polímeros sintéticos apropiados incluyen óxido de polietileno, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polietilen glicol y óxido de polietileno/óxido de polipropileno. La matriz puede contener igualmente plastificantes y agentes anti-aglomerantes. Plastificantes apropiados útiles en la presente invención incluyen polioles tales como glicerol, propilen glicol, polietilen glicol (PEG), urea, u otros

plastificantes conocidos, tales como citrato de trietilo, ftalato de dibutilo o dimetilo o agua. Agentes anti-aglomerantes apropiados incluyen materiales finos insolubles o moderadamente solubles tales como talco, TiO_2 , arcillas, sílice amorfo, estearato de magnesio, ácido esteárico y carbonato de calcio.

[162] Los gránulos de la matriz pueden contener además una capa de barrera. Una capa de barrera se usa para desacelerar o impedir la difusión de sustancias que pueden afectar negativamente la proteína o enzima en la matriz. La capa de barrera se compone de un material de barrera y puede aplicarse sobre el núcleo de la proteína o el material de barrera puede incluirse en el núcleo de la proteína. Materiales de barrera apropiados incluyen, por ejemplo, sales inorgánicas o ácidos orgánicos o sales. La matriz sin la proteína puede usarse igualmente como una capa de barrera.

[163] Los gránulos de la matriz pueden contener asimismo una o más capas recubridoras. Por ejemplo, tales capas recubridoras pueden ser una o más capas recubridoras intermedias, o tales capas recubridoras pueden ser una o más capas recubridoras externas, o una combinación de las anteriores. Capas recubridoras pueden servir cualquiera de un número de funciones en una composición de gránulos, dependiendo del uso final del gránulo de enzima. Por ejemplo, los recubrimientos pueden hacer la enzima resistente a la oxidación por un blanqueador, producir los índices deseables de disolución luego de la introducción del gránulo en un medio acuoso, o proporcionar una barrera contra la humedad ambiente, con el fin de mejorar la estabilidad de almacenamiento de la enzima y reducir la posibilidad de crecimiento microbiano en el gránulo.

[164] Recubrimientos apropiados incluyen polímeros formadores de película, solubles en agua o dispersables en agua tales como alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona (PVP), derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxixelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polietilen glicol, óxido de polietileno, goma arábica, xantana, carragenina, quitosana, polímeros de látex, y recubrimientos entéricos. Además, pueden usarse agentes de recubrimiento conjuntamente con otros agentes activos de categorías idénticas, o diferentes.

[165] PVAs apropiados para incorporación en la capa(s) recubridora(s) del gránulo incluyen PVAs parcialmente hidrolizados, completamente hidrolizados e intermediamente hidrolizados que tienen grados bajos a altos de viscosidad. Preferiblemente, la capa recubridora externa contiene PVA parcialmente hidrolizado con baja viscosidad. Otros polímeros vinílicos que pueden ser útiles incluyen acetato de polivinilo y polivinil pirrolidona. Copolímeros útiles incluyen, por ejemplo, copolímero de PVA-metilmetacrilato y copolímero de PVP-PVA. Las capas recubridoras pueden contener además uno o más de los siguientes: plastificantes, extensores, lubricantes, pigmentos y, opcionalmente, enzimas adicionales. Plastificantes apropiados útiles en las capas recubridoras de la presente invención son plastificantes que incluyen, por ejemplo, polioles tales como azúcares, alcoholes de azúcar, o polietilen glicoles (PEGs), urea, glicol, propilen glicol u otras plastificantes conocidos tales como citrato de trietilo, ftalato de dibutilo o dimetilo o agua. Pigmentos apropiados útiles en las capas recubridoras de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, blanqueadores finamente divididos, tales como dióxido de titanio o carbonato de calcio, o pigmentos coloreados y colorantes, o una combinación de los anteriores. Preferiblemente tales pigmentos son pigmentos con bajo contenido de residuos luego de la disolución. Extensores apropiados incluyen azúcares tales como sucrosa o hidrolizados de almidón, tales como maltodextrina, y sólidos de jarabe de maíz, arcillas tales como caolín y bentonita y talco. Lubricantes apropiados incluyen tensoactivos no iónicos tales como Neodol, alcoholes de cebo, ácidos grasos, sales de ácidos grasos tales como estearato de magnesio y ésteres de ácidos grasos.

Formulaciones Líquidas

[166] La invención provee formulaciones líquidas que contienen enzima, las cuales incluyen una enzima insoluble en una composición con células microbianas y/o residuos celulares, por ejemplo, recuperada como se describe más arriba. La enzima es enzimáticamente activa o tiene potencial catalítico, *es decir*, es capaz de actividad catalítica en un análisis o aplicación de uso en un disolvente apropiado y condiciones para que ocurra actividad catalítica, en la formulación líquida. En varias incorporaciones, la formulación líquida puede incorporar ingredientes de formulación (sustancias estabilizantes) que "estabilizan," *es decir*,

mantienen las propiedades físicas y bioquímicas del producto durante el almacenamiento, incluyendo, pero no limitados a, los siguientes: uno o más polioles, una o más sales, una o más sustancias preservantes, o una o más sales amortiguadoras (y un ácido o base para ajuste de pH), uno o más tensoactivos, uno o más aminoácidos, uno o más antioxidantes, o una combinación de los anteriores. En algunas incorporaciones, la formulación líquida incluye uno o más polioles, por ejemplo, glucosa, sucrosa, sorbitol, glicerol, lactosa, dextrosa, propilen glicol, en una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 50% (w/v). En algunas incorporaciones, la formulación líquida incluye una o más sales, por ejemplo, NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄, formiato de sodio, citrato de sodio, glutamato monosódico, cloruro de calcio, en una concentración de alrededor de 0,1 a alrededor de 50% (w/v). En algunas incorporaciones, la formulación líquida incluye uno o más agentes preservantes, por ejemplo, benzoato de sodio, propionato de sodio, sorbato de potasio, parabeno, en una concentración de alrededor de 0,1 a alrededor de 5% (w/v). En algunas incorporaciones, la formulación líquida incluye una o más sales amortiguadoras, por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, MES, HEPES, en una concentración de 0,1 a alrededor de 20% (w/v). Un ácido (v.g., un ácido débil, tal como ácido acético o ácido fórmico, o un ácido fuerte, tal como HCl o H₂SO₄) o una base (v.g., NaOH o KOH) puede usarse para ajuste del pH. Para una referencia que describe formulaciones líquidas generalmente, véase *Isolation and Purification of Proteins* (2003) R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson, ed., Marcell Dekker, Inc., páginas 549-604.

[167] La invención provee igualmente métodos para preparar formulaciones líquidas que incluyen una enzima insoluble, por ejemplo, recuperada como se describe más arriba, en una composición con células microbianas y/o residuos celulares, en donde la enzima es enzimáticamente activa en la formulación líquida. En una incorporación, el método comprende proveer una composición que contiene una enzima insoluble, por ejemplo, recuperada como se describe más arriba, y células microbianas y/o residuos celulares, solubilizando parcial o completamente la enzima insoluble, por ejemplo, combinando la composición con uno o más ingredientes de formulación, como se describe más arriba, v.g., uno o más poliol, una o más sal, una o más sustancia preservante, y/o una o más sal amortiguadora, opcionalmente en un líquido, normalmente agua, produciendo así una formulación líquida. En una incorporación, el método comprende proveer una

composición que contiene una enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, por ejemplo, recuperada como se describe más arriba, solubilizar la enzima insoluble, por ejemplo, combinar la composición con uno o más ingredientes de formulación, como se describe más arriba, v.g., uno o más poliol, una o más sal, una o más sustancia preservante, y/o una o más sal amortiguadora, con la composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, opcionalmente en un líquido, normalmente agua, y clarificar la composición que contiene enzima soluble extrayendo células microbianas y/o residuos celulares, por ejemplo, mediante filtración, tal como filtración de membrana, y/o centrifugación, produciendo así una formulación líquida clarificada.

Composiciones

[168] La invención provee composiciones, que incorporan gránulos que contienen enzima, o formulaciones líquidas, como se describe más arriba. Aparte de los gránulos, que contienen enzima, o formulaciones líquidas, las composiciones incorporan componentes apropiados para uso de los gránulos o formulaciones líquidas en aplicaciones particulares de uso, tales como aplicaciones de limpieza (v.g., detergentes), procesamiento de textiles, forrajes para animales, elaboración de cerveza, horneado, alimentos, o bebidas.

Composiciones Limpiadoras

[169] En algunas incorporaciones, gránulos que contienen enzima, o formulaciones líquidas, como se describe en esta especificación, se incorporan en una composición limpiadora, tal como un detergente, v.g., para uso en lavandería o lavado de platos, para proporcionar un rendimiento limpiador y/o beneficios de limpieza. Enzimas apropiadas para inclusión en una composición limpiadora incluyen, pero no se limitan a, hemicelulasas, peroxidasas, proteasas, celulasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tannasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, laccasas, perhidrolasas, y amilasas, o mezclas de las anteriores. Una combinación típica es un cóctel de enzimas aplicables convencionales como

proteasa, lipasa, cutinasa y/o celulasa en conjunción con amilasa.

[170] Pueden incluirse igualmente materiales accesorios en la composición limpiadora, por ejemplo, para ayudar a mejorar el rendimiento limpiador, para tratamiento del sustrato que se va a limpiar, o para modificar la estética de la composición limpiadora, como es el caso con perfumes, colorantes, tinturas o similares. Se entiende que tales materiales accesorios son en adición a los gránulos que contienen enzima, como se describe en esta especificación. La naturaleza precisa de estos componentes adicionales, y los niveles de incorporación de los mismos, dependerán de la forma física de la composición y la naturaleza de la operación de limpieza para la cual se va a usar. Materiales accesorios apropiados incluyen, pero no se limitan a, tensoactivos, mejoradores de detergente, agentes quelantes, agentes inhibidores de la transferencia de colorantes, axiliares de deposición, dispersantes, estabilizantes de enzimas, materiales catalíticos, activadores de blanqueado, reforzadores de blanqueado, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de suciedad/anti-redeposición, abrillantadores, supresores de espuma de jabón, colorantes, perfumes, agentes elastificantes de la estructura, suavizadores de telas, vehículos, hidrótrofos, auxiliares de procesamiento y/o pigmentos. Aparte de la siguiente divulgación, ejemplos apropiados de tales otros materiales accesorios y niveles de uso se describen en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,576,282, 6,306,812, y 6,326,348.

[171] En algunas incorporaciones, la composición limpiadora no contiene fosfato. En algunas incorporaciones, la composición limpiadora es un detergente para lavar platos que no contienen fosfato. En algunas incorporaciones, la composición limpiadora es un detergente para lavandería que no contiene fosfato. En algunas incorporaciones, la composición limpiadora, que no contiene fosfato, incorpora un mejorador de detergente sin fosfato, *v.g.*, citrato.

[172] Tensoactivos – Una composición limpiadora, como se describe en esta especificación, puede incluir un tensoactivo o un sistema tensoactivo en donde el tensoactivo puede seleccionarse de tensoactivos no iónicos, tensoactivos aniónicos, tensoactivos catiónicos, tensoactivos anfólicos, tensoactivos zwitteriónicos, tensoactivos no iónicos semi-polares, y mezclas de los anteriores.

Un tensoactivo está normalmente presente en un nivel de alrededor de 0,1% a alrededor de 60%, alrededor de 1% a alrededor de 50% o alrededor de 5% a alrededor de 40% en peso de la composición limpiadora en cuestión.

[173] Mejoradores de Detergente – Una composición limpiadora como se describe en esta especificación puede incluir uno o más mejoradores de detergente o sistemas mejoradores de detergente. Cuando se usa un mejorador de detergente, la composición limpiadora en cuestión incluirá normalmente por lo menos alrededor de 1%, alrededor de 3% a alrededor de 60%, o alrededor de 5% a alrededor de 40% de mejorador de detergente en peso de la composición limpiadora en cuestión.

[174] Mejoradores de detergente incluyen, pero no se limitan a, mejoradores de sales de metal alcalino, amonio y alcanolamonio de polifosfatos, silicatos de metal alcalino, carbonatos alcalinotérreos y de metal alcalino, aluminosilicato, compuestos de policarboxilato, éter hidroxipolicarboxilatos, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o éter vinilmetílico, ácido 1,3,5-trihidroxi benceno - 2,4,6-trisulfónico, y ácido carboximetiloxisuccínico, las diferentes sales de metal alcalino, sales de amonio y amonio sustituido de ácidos poliacéticos tales como ácido etilendiamina tetraacético y ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos tales como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidisuccínico, ácido polimaleico, ácido benceno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico, y sales soluble de los anteriores.

[175] Agentes Quelantes – Una composición limpiadora, como se describe en esta especificación, puede contener uno o más agentes quelantes. Agentes quelantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso, y mezclas de los anteriores. Cuando se usa un agente quelante, la composición limpiadora puede incluir alrededor de 0,1% a alrededor de 15%, o alrededor de 3,0% a alrededor de 10% de agente quelante en peso de la composición limpiadora en cuestión.

[176] Auxiliar de Deposición – Una composición limpiadora como se describe en esta especificación puede contener uno o más auxiliares de deposición. Auxiliares de deposición apropiados incluyen, pero no se limitan a, polietilen glicol,

polipropilén glicol, policarboxilato, polímeros de liberación de suciedad tales como ácido politeftálico, y arcillas tales como caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, haloisita, y mezclas de las anteriores.

[177] Agentes Inhibidores de Transferencia de Colorantes – Una composición limpiadora como se describe en esta especificación puede incluir uno o más agentes inhibidores de transferencia de colorantes. Agentes inhibidores de transferencia de colorantes, apropiados, incluyen, pero no se limitan a, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas, y polivinilimidazoles, y mezclas de los anteriores. Cuando está presente en una composición limpiadora en cuestión, el agente inhibidor de transferencia de colorantes puede estar presente en niveles de alrededor de 0,0001% a alrededor de 10%, alrededor de 0,01% a alrededor de 5%, o alrededor de 0,1% a alrededor de 3% en peso de la composición limpiadora.

[178] Dispersantes – Una composición limpiadora como se describe en esta especificación puede contener uno o más dispersantes. Dispersantes orgánicos apropiados, solubles en agua, incluyen, pero no se limitan a, los ácidos homo- o co-poliméricos o sus sales, en los cuales el ácido policarboxílico incluye por lo menos dos radicales carboxilo separados uno de otro por no más de dos átomos de carbono.

[179] Estabilizadores de Enzima – Las enzimas para uso en detergentes pueden estabilizarse por varias técnicas. Enzimas empleadas en esta especificación pueden estabilizarse, por ejemplo, por la presencia de fuentes solubles en agua de iones de calcio y magnesio en las composiciones terminadas, que proporcionan tales iones a las enzimas.

[180] Complejos Metálicos Catalíticos – Una composición limpiadora como se describe en esta especificación puede incluir uno o más complejos metálicos catalíticos. Un tipo de catalizador blanqueador con contenido de metal es un sistema catalizador que incluye un catión de metal de transición o de actividad catalítica blanqueadora definida, tales como cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, tungsteno, molibdeno, o manganeso, un catión de metal auxiliar que tiene

poca o ninguna actividad catalítica blanqueadora, tal como cationes de zinc o aluminio, y un secuestrante con constantes de estabilidad definidas para los cationes de metal auxiliares y catalíticos, particularmente ácido etilen diamina tetraacético, ácido etilen diaminatetra (metilen fosfónico) y sales solubles en agua de los mismos. Tales catalizadores se divulgan en la Patente de los Estados Unidos No. 4,430,243. Catalizadores que contienen manganeso, útiles en esta solicitud, son conocidos, y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,576,282. Catalizadores blanqueadores de cobalto, útiles en esta especificación, son conocidos, y se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,597,936 y 5,595,967. Tales catalizadores de cobalto se preparan fácilmente por procedimientos conocidos, tales como los enseñados por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,597,936 y U.S. 5,595,967.

[181] Composiciones en esta especificación pueden incluir igualmente un complejo de metal de transición de un ligando rígido macropolicíclico – abreviado como "MRL – *macropolycyclic rigid ligand*". Como asunto práctico, y no a modo de limitación, las composiciones y procesos de limpieza en esta especificación pueden ajustarse para proporcionar en el orden de, por lo menos, una parte por cien millones de la especie MRL activo en el medio de lavado acuoso y, a menudo, proporcionarán alrededor de 0,005 ppm a alrededor de 25 ppm, alrededor de 0,05 ppm a alrededor de 10 ppm, o alrededor de 0,1 ppm a alrededor de 5 ppm, del MRL en el líquido de lavado. Metales de transición apropiados en un catalizador blanqueador de metal de transición incluyen manganeso, hierro y cromo. En una incorporación, un MRL es un ligando ultra-rígido que se puentea cruzadamente, tal como 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2] hexadecano. MRLs de metal de transición apropiados se preparan fácilmente por procedimientos conocidos, tales como los enseñados por ejemplo en la Solicitud PCT No. WO 00/332601 y la Patente de los Estados Unidos No. 6,225,464.

[182] Las composiciones limpiadoras divulgadas en esta especificación pueden usarse para limpiar un sitio en una superficie o tela. Normalmente por lo menos una porción del sitio se pone en contacto con una composición limpiadora como se describe más arriba, en forma pura o diluida en un líquido de lavado, y luego el sitio se lava y/o se enjuaga opcionalmente. El lavado incluye, pero no se limita a, restregado, y agitación mecánica. Una tela puede incluir casi cualquier tela capaz

de ser lavada en condiciones de uso por un consumidor normal. Las composiciones limpiadoras divulgadas se emplean normalmente en concentraciones de desde alrededor de 500 ppm a alrededor de 15.000 ppm en solución. Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua varía normalmente desde alrededor de 5 °C a alrededor de 90 °C y, cuando el sitio incluye una tela, la relación de agua a masa de la tela es normalmente desde alrededor de 1:1 a alrededor de 30:1.

Composiciones para el Procesamiento de Textiles

[183] En algunas incorporaciones, gránulos que contienen enzima o formulaciones líquidas, como se describe en esta especificación, se incorporan en una composición para el procesamiento de textiles. Enzimas apropiadas para inclusión en una composición para procesamiento de textiles incluyen, pero no se limitan a, celulasas, perhidrolasas, poliesterasas, amilasas, catalasas, pectinasas, y laccasas. En algunas incorporaciones, una composición para procesamiento de textiles puede incluir igualmente un agente anti-redeposición (v.g., Repel-O-Tex, Sorez 100 (ISP Corp.)).

Composiciones para Forrajes para Animales

[184] En algunas incorporaciones, gránulos que contienen enzima o formulaciones líquidas, como se describe en esta especificación, se incorporan en una composición para forrajes para animales. Enzimas apropiadas para inclusión en una composición para forrajes incluyen enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. Ejemplos no limitantes de enzimas apropiadas para incorporación en una composición para forrajes incluyen fitasas, xilanasas, fosfatasas, proteasas, amilasas, esterasas, enzimas redox, lipasas, transferasas, celulasas, fosfolipasas, ligninasas, y β -glucanasas.

[185] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de Concentrado de Enzima y Formulaciones Granulares de Caldo de Fermentación que contiene Enzima Precipitada Parcialmente usando un Proceso de Recuperación Convencional

Preparación de Lisado Bacteriano

[186] *Bacillus licheniformis*, que expresa en forma recombinante la enzima α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía la enzima precipitada. Una muestra del caldo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante contenía 10% de la actividad total de la enzima, medida en el caldo entero antes de la centrifugación. El 90% de la enzima era insoluble. Se determinó la actividad de la α -amilasa, como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 12/041,917.

[187] Para la lisis de las células, se ajustó la temperatura del caldo a 40°C y se agregó 0,01% (w/w) de lisozima. El caldo se mantuvo durante 48 horas, y luego se diluyó con 0,6 partes de agua y se floculó inmediatamente con 4% (w/w) de polímero catiónico (C581, de Cytec Industries, Inc.). Se agregó tierra de diatomeas (FW12, de World Minerals) al 4% (w/w) al caldo floculado y se filtró a través de un filtro de vacío de extremo cerrado, equipado con una almoha filtrante HR9000 recubierta con una torta de diatomeas FW12. El rendimiento de la enzima en el filtrado luego de la separación de las células fue del 6%.

[188] El filtrado clarificado se concentró con un ultrafiltro equipado con una membrana de espiral (KOCH Membrane Systems) de poliétersulfona (PES) con un valor de corte de peso molecular (MWCO - *molecular weight cutoff*) de 10K. El concentrado final contenía 11,5 g/l o 1,15% (w/v) de α -amilasa activa y 27,04% (w/w) de materia sólida seca.

[189] El rendimiento total para este proceso fue del 5% de la actividad de la enzima de partida en caldo entero, y la pureza fue de 4,3% (sólidos secos

activos/sólidos secos totales).

Formulación Granular

[190] Se preparó una composición granular del concentrado de enzima en la siguiente forma.

[191] **Aspersión 1:** 513 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de diámetro de partícula de 150 µm a 350 µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 2.062 gramos de solución que contenía 11,5 g/L de amilasa activa, 1,6% de talco (Nytal 400), 0,5% de alcohol polivinílico (Erkol 5/88), 1,0% anti-espumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), y 1,6% almidón de maíz (Cargill Foods) se aplicaron por aspersión a los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	3,6 gpm (gramos por minuto), incrementando a 13,6 gpm durante 1,5 horas. Mantenido a 13,6 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	69°C, incrementada a 72°C después de 30 minutos
Temperatura de Salida	entre 43,9°C y 46,2°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,15 m ³ /minuto y 2,30 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	206,7 kPa, incrementando a 275,6 kPa durante 1,5 horas

Se recolectaron 1.043 gramos de producto.

[192] **Aspersión 2:** 1.043 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.667 gramos de una solución acuosa que contenía 333 gramos de sulfato de sodio (20 % de la composición de gránulos) se aplicaron por aspersión sobre los gránulos de enzima.

Los parámetros de recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	8,3 gpm (gramos por minuto), incrementando a 19,2 gpm durante 15 minutos. Mantenida a 19,2 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	63°C, incrementada a 80°C después de 15 minutos
Temperatura de Salida	entre 44,2°C y 47,8°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,25 m ³ /minuto y 2,34 m ³ /minuto
Presión del Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.363 del producto.

[193] Aspersión 3: 1.363 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.065 gramos de una solución acuosa que contenía 83 gramos (5% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), 83 gramos (5% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), y 25 gramos (1,5% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima.

Los parámetros de recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	4,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a 12,2 gpm durante 30 minutos. Mantenida a 12,2 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	75°C, incrementada a 78°C después de 30 minutos
Temperatura de Salida	entre 46,0°C y 52,4°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,22 m ³ /minuto y 2,30 m ³ /minuto
Presión del Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.487 gramos de producto final.

[194] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron

los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 1,66 mg/almohada.

Ejemplo 2

Preparación de Concentrado de Enzima y Formulación Granular de Caldo de Fermentación que contiene Enzima Precipitada Parcialmente Disolviendo el Precipitado, seguido por un Proceso de Recuperación Convencional

Preparación del Concentrado de Enzima

[195] *Bacillus licheniformis*, que expresa en forma recombinante la enzima α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía la enzima precipitada. Una muestra del caldo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante contenía 5% de la actividad total de la enzima, medida en el caldo entero antes de la centrifugación. El 95% de la enzima era insoluble.

[196] Para la lisis de las células, se ajustó la temperatura del caldo a 40°C y se agregó 0,01% (w/w) de lisozima. El caldo se mantuvo durante 1,5 horas. A continuación se incrementó la temperatura a 60°C y se mantuvo a 60°C durante 1 hora. El caldo se diluyó entonces con 1 parte de agua.

[197] La enzima precipitada permaneció insoluble luego del paso térmico y la dilución. El lisado se incubó entonces mezclando suavemente a temperatura ambiente durante 28 horas con 5% (w/w) de glucosa y 3% (w/w) de NaCl a pH 9 antes de la separación de las células. En su mayor parte la actividad de la α -amilasa precipitada (84%) era solubilizada.

[198] El lisado se floculó entonces con 4% (w/w) de polímero catiónico (C581, de Cytec Industries, Inc.). Se agregó tierra de diatomeas (FW12, de World Minerals) al 4% (w/w) al caldo floculado y se filtró a través de un filtro de tambor rotatorio en vacío, pre-recubierto con una torta de diatomeas FW12. El rendimiento de la enzima en el filtrado después de la separación de las células fue de 87%.

[199] El filtrado clarificado se concentró con un ultrafiltro equipado con una membrana de espiral (KOCH Membrane Systems) de poliétersulfona (PES) con un valor de corte de peso molecular (MWCO - *molecular weight cutoff*) de 10K. El concentrado final contenía 60 g/l o 6% (w/v) de α -amilasa activa y 27% (w/w) de materia sólida seca.

[200] El rendimiento total para este proceso fue de 84% de la actividad de la enzima de partida en el caldo entero y la pureza fue de 22% (sólidos secos activos/sólidos secos totales). Sin embargo, el concentrado contenía glucosa y NaCl. La extracción de estas sustancias impactaría negativamente el costo del proceso.

Formulación Granular

[201] Se preparó una composición granular del concentrado de la enzima en la siguiente forma.

[202] **Aspersión 1:** 478 gramos de cristales de sucrosa, con un intervalo de tamaño de diámetro de partícula de 200µm a 600µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 628 gramos de solución que contenía 60,0 g/L de amilasa activa, 115 gramos (9,8% de la composición de gránulos) de almidón de maíz (Cargill Foods) se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sucrosa. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	2,9 gpm (gramos por minuto), incrementando a 17,3 gpm durante 52 minutos. Mantenido a 20,2 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	entre 71 °C y 74 °C para la aspersión 1
Temperatura de Salida	entre 44,7°C y 48,5°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,36 m ³ /minuto y 2,47 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	220,5 kPa, incrementando a 275,6 kPa durante 52 minutos.

Se recolectaron 700 gramos de producto.

[203] Aspersión 2: 700 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.308 gramos de una solución acuosa que contenía 120 gramos (10,2% de la composición de gránulos) de sucrosa (C&H Sugars), 120 gramos (10,2% de la composición de gránulos) de almidón de maíz (Cargill Foods), 72 gramos (6,1% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 DuPont), y 15 gramos (1,3% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima.

Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	12,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a 20,2 gpm durante 10 minutos. Mantenido a 20,2 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	74°C, incrementada a 82°C después de 15 minutos
Temperatura de Salida	entre 46,3°C y 47,7°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,41 m ³ /minuto y 2,50 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 241,2 kPa y 248,0 kPa.

Se recolectaron 988 gramos del producto.

[204] Aspersión 3: 988 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 586 gramos de una solución acuosa que contenía 29 gramos (2,5% de la composición de gránulos) de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E-15 Dow Chemicals), y 4 gramos (0,3% de la composición de gránulos) de polietilen glicol 600 (Carbowax by Electron Microscopy Sciences) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima.

Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	8,1 gpm (gramos por minuto), incrementando a 15,6 gpm durante 45 minutos. Mantenida a 15,6 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	entre 75 °C y 82 °C
Temperatura de Salida	entre 43,6°C y 50,3°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,41 m ³ /minuto y 2,48 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	275,6 kPa.

Se recolectaron 1.014 gramos de producto final.

[205] Usando el ensayo de abrasión de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 2,80 mg/almohada.

Ejemplo 3

Preparación de Concentrado de Enzima y Formulación Granular de Lisado Celular Homogeneizado de Caldo de Fermentación que contiene Enzima Precipitada Parcialmente

Preparación de Lisado Celular Homogeneizado

[206] *Bacillus licheniformis*, que expresa en forma recombinante la enzima α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía la enzima precipitada. Una muestra del caldo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante contenía 6% de la actividad total de la enzima, medida en el caldo entero antes de la centrifugación.

[207] La lisis de las células se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2. El lisado se enfrió entonces a 10°C y se homogeneizó a 41.340 kPa en un Homogeneizador Gaulin. El rendimiento de la enzima fue del 90%, y la pureza fue del 6% (sólidos secos activos/sólidos secos totales).

Formulación Granular

[208] Se preparó una composición granular del lisado homogeneizado en la siguiente forma.

[209] **Aspersión 1:** 17,64 kilogramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 µm a 350 µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. A esto, 259,41 kilogramos de solución que contenía 12,53 g/L de amilasa activa, 5,88 kilogramos (5% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400), 1,18 kilogramos (1,0% de la composición de gránulos) de anti-espumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), 7,06 kilogramos (6% de la composición de gránulos) de almidón de maíz (Cargill Foods), y 1,18 kilogramos (1,0% de la composición de gránulos) Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	50 gpm (gramos por minuto), incrementando a 500 gpm durante 3 horas. Mantenido a 500 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	entre 73°C y 85°C
Temperatura de Salida	entre 42,7°C y 55,7°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 22,64 m ³ /minuto y 26,94 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	413,4 kPa, incrementando a 468,52 kPa durante 5 horas.

Se recolectaron 65,2 kilogramos de producto.

[210] **Aspersión 2:** 65,2 kilogramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. 111,11 kilogramos de una solución acuosa que contenía 22,22 kilogramos de sulfato de sodio (20 % de la composición de gránulos) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 500 gpm (gramos por minuto) a 580 gpm durante toda la aspersión 2.
Temperatura de Entrada	85°C
Temperatura de Salida	entre 48,3°C y 54,1°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 31,38 m ³ /minuto y 34,92 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	482,3 kPa

Se recolectaron 88 kilogramos de producto.

[211] Aspersión 3: 84,967 kilogramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. 84,97 kilogramos de una solución acuosa que contenía 6,12 kilogramos (5.2% de la composición de gránulos) de alcohol of polivinílico (5/88 de Erkol), 6,12 kilogramos (5,2% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), 1,53 kilogramos (1.3% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400) y 1,53 kilogramos (1,3% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 310 gpm (gramos por minuto) a 400 gpm durante toda la aspersión 3.
Temperatura de Entrada	85°C
Temperatura de Salida	entre 48,8°C y 56,8°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 30,3 m ³ /minuto y 35,0 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 482,3 kPa y 523,6 kPa

Se recolectaron 97,6 kilogramos de producto.

[212] Aspersión 4: 97,6 kilogramos de los gránulos de enzima de la aspersión 3 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. 9,41 kilogramos de una solución acuosa que contenía 471 gramos (0,4% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima.

Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	295 gpm durante toda la aspersión 4
Temperatura de Entrada	85°C
Temperatura de Salida	entre 47,1°C y 51,1°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 31,9 m ³ /minuto y 34,5 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 447,9 kPa y 468,5 kPa

Se recolectaron 101,2 kilogramos de producto.

[213] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 0,33 mg/almohada.

Ejemplo 4

Preparación de Concentrado de Enzima y Formulación Granular de Lisados de Células Homogeneizados y Diafiltrados de Caldo de Fermentación que contiene Enzima Precipitada Parcialmente

Preparación de Lisado de Células Homogeneizado

[214] *Bacillus licheniformis*, que expresa en forma recombinante la enzima α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía la enzima precipitada. Se preparó un lisado homogeneizado como se describe en el Ejemplo 3.

[215] El lisado homogeneizado se diafiltró y se concentró con un ultrafiltro equipado con una membrana de espiral (KOCH Membrane Systems) de poliétersulfona (PES) con un valor de corte de peso molecular (MWCO - *molecular weight cutoff*) de 10K. El concentrado final contenía 11 g/l o 1,1% (w/v) de α -amilasa activa y 16,7% (w/w) de materia sólida seca.

[216] El lisado homogeneizado se diafiltró usando agua corriente. Se realizó diafiltración con volumen constante, *es decir*, manteniendo constante el volumen en el tanque de alimentación que contenía el lisado homogeneizado, agregando agua corriente para reemplazar el volumen de permeado eliminado del sistema. La cantidad total de agua de diafiltración utilizada fue 0,5x del lisado homogeneizado inicial. El lisado homogeneizado diafiltrado se concentró aún más a 16% (w/w) de sólidos secos. La pureza de la preparación resultante fue de 9,3% (sólidos secos activos/sólidos secos totales). La pureza fue de 1,25 veces mayor que el lisado homogeneizado preparado en el Ejemplo 3.

Formulación Granular

[217] Se preparó una composición granular del lisado homogeneizado y diafiltrado en la siguiente forma.

[218] **Aspersión 1:** 29,606 kilogramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 μ m a 350 μ m, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. A esto, 170,79 kilogramos de solución que contenía 14,2 g/L de la amilasa activa, 5,88 kilogramos (5% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400), 1,18 kilogramos (1,0% de la composición de gránulos) de antiespumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), 11,77 kilogramos (10% de la composición de gránulos) de almidón de maíz (Cargill Foods), y 1,18 kilogramos (1,0% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	106 gpm (gramos por minuto), incrementando a 550 gpm durante 5 horas. Mantenido a 550 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	entre 80°C y 82,6°C
Temperatura de Salida	entre 51,0°C y 60,9°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 22,8 m ³ /minuto y 29,9 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	447,9 kPa, incrementando a 482,3 m ³ /minuto durante 5 horas.

Se recolectaron 66,6 kilogramos de producto.

[219] Aspersión 2: 66,6 kilogramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. 111,11 kilogramos de una solución acuosa que contenía 22,22 kilogramos de sulfato de sodio (20 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 400 gpm (gramos por minuto) a 640 gpm durante toda la aspersión 2.
Temperatura de Entrada	entre 83,5°C y 85,6 °C
Temperatura de Salida	entre 51,4°C y 54,8°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 31,0 m ³ /minuto y 35,3 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	482,3 kPa

Se recolectaron 93,8 kilogramos de producto.

[220] Aspersión 3: 93,8 kilogramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. 84,97 kilogramos de una solución acuosa que contenía 6,12 kilogramos (5,2% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), 6,12 kilogramos (5,2% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), 1,53

kilogramos (1,3% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400) y 1,53 kilogramos (1,3% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 200 gpm (gramos por minuto) a 410 gpm durante toda la aspersión 3.
Temperatura de Entrada	entre 79,6°C y 83,9 °C
Temperatura de Salida	entre 55,9°C y 59,6°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 31,7 m ³ /minuto y 35,2 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 482,3 kPa y 516,75 kPa

Se recolectaron 108,4 kilogramos de producto.

[221] Aspersión 4: 108,4 kilogramos de los gránulos de enzima de la aspersión 3 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Deseret 60 y se fluidizaron. 9,41 kilogramos de una solución acuosa que contenía 471 gramos (0,4% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	250 gpm durante toda la aspersión 4
Temperatura de Entrada	entre 82,7°C y 82,9 °C
Temperatura de Salida	entre 57,4°C y 59,7°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 32,74 m ³ /minuto y 36,76 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	482,3 kPa

Se recolectaron 110,0 kilogramos de producto.

[222] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 0,15 mg/almohada.

Ejemplo 5

Preparación de Concentrado de Enzima y Formulación Granular de Lisado de Células Diafiltrado de Caldo de Fermentación que contenía Enzima Precipitada Parcialmente

Preparación de Lisado de Células Diafiltrado

[223] *Bacillus licheniformis*, que expresa en forma recombinante la enzima α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía la enzima precipitada. Las células se lisaron como se describe en el Ejemplo 2. El lisado se diafiltró usando agua corriente como se describe en el Ejemplo 4. El lisado diafiltrado se concentró aún más a 18,2% (w/w) de sólidos secos. La pureza de la preparación resultante fue de 17% (sólidos secos activos/sólidos secos totales). La pureza fue de 1,7 veces mayor que el lisado homogeneizado preparado en el Ejemplo 3.

Ejemplo 6

Preparación de Concentrado de Enzima y Formulación Granular de Lisado de Células Diafiltrado de Caldo de Fermentación que contenía Enzima Precipitada Parcialmente

Preparación de Lisado de Células Diafiltrado

[224] *Bacillus licheniformis*, que expresa la enzima α -amilasa, como se describe en la Solicitud PCT No. WO08/112459, se fermentó como se describe en el Ejemplo 1. El lisado se diafiltró y se concentró como en el Ejemplo 5. La preparación resultante tenía una actividad de enzima de 2,14% y los sólidos secos fueron de 17,2%.

Formulación Granular

[225] Se preparó una composición granular del lisado diafiltrado en la siguiente forma.

[226] **Aspersión 1:** 691 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 μm a 350 μm , se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 1.470 gramos de solución que contenía 23,41 g/L de la amilasa activa, 5% de talco (Nytal 400), 1,0% de antiespumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), y 5% de almidón de maíz (Cargill Foods) se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	2,6 gpm (gramos por minuto), incrementando a 14,1 gpm durante 1,5 horas.
Temperatura de Entrada	69°C, incrementada a 72°C después de 30 minutos
Temperatura de Salida	entre 44,9°C y 45,8°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,2 m ³ /minute y 2,3 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	206,7 kPa, incrementando a 275,6 kPa 1,5 horas.

Se recolectaron 1.050 gramos de producto.

[227] **Aspersión 2:** 1.050 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.667 gramos de una solución acuosa que contenía 333 gramos de sulfato de sodio (20 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 15,6 gpm (gramos por minuto) y 17,4 gpm
Temperatura de Entrada	entre 78°C y 82°C

Temperatura de Salida	entre 46,0°C y 47,5°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,2 m ³ /minuto y 2,3 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.352 gramos de producto.

[228] Aspersión 3: 1.352 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.127 gramos de una solución acuosa que contenía 88 gramos (5% de la composición de gránulos) de alcohol of polivinílico (5/88 de Erkol), 88 gramos (5% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), y 26 gramos (1,5% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	3,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a 10,2 gpm durante 60 minutos. Mantenida a 10,2 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	75°C, incrementada a 80C después de 10 minutos
Temperatura de Salida	entre 52,0°C y 53,7°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,3 m ³ /minuto y 2,4 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.535 gramos de producto final.

[229] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 1,50 mg/almohada.

Ejemplo 7

Preparación de Concentrado de Caldo Bacteriano con Enzima Soluble y Formulación Granular

Preparación del Concentrado de Enzima

[230] *Bacillus subtilis*, que expresa la proteasa subtilisina, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía en su mayor parte la enzima subtilisina soluble. El caldo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante contenía actividad que era la misma que la actividad en una muestra de caldo entero. El caldo se ajustó a pH $5,8 \pm 0,2$, se diluyó con $1,5 \pm 0,2$ partes de agua corriente y se floculó inmediatamente con 8% C311 (Kemira). El caldo floculado se filtró a través de un filtro con tambor rotatorio en vacío, pre-recubierto con tierra de diatomeas (FW12, de World Minerals). El filtrado clarificado se concentró con un ultrafiltro equipado con una membrana (KOCH Membrane Systems) de espiral PES MWCO 10K. El concentrado final contenía 57,23 g/L y 19,1% (w/w) de materia sólida seca. La actividad de la subtilisina en el concentrado de enzima permaneció soluble antes de la granulación, como se determinó por la actividad del sobrenadante (14.000 rpm, 4 minutos) del concentrado de enzima, la cual fue la misma actividad que la actividad del concentrado de enzima entera.

Formulación Granular

[231] Se preparó una composición granular del concentrado de ultrafiltración en la siguiente forma.

[232] **Aspersión 1:** 643 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 μm a 350 μm , se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 593 gramos de solución que contenía una proteasa activa, 0,7% de talco (Nytal 400), 0,9% de antiespumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), y 0,5% de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	3,5 gpm (gramos por minuto), incrementando a 9,0 gpm durante 1,5 horas.
Temperatura de Entrada	57°C, incrementada a 86°C después de 1 hora 15 minutos
Temperatura de Salida	entre 45,2°C y 48,9°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,05 m ³ /minuto y 2,4 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	206,7 kPa, incrementando a 254,9 kPa durante 30 minutos.

Se recolectaron 769 gramos de producto.

[233] Aspersión 2: 769 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 2.001 gramos de una solución acuosa que contenía 400 gramos de sulfato de sodio (27,7 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 10 gpm (gramos por minuto) y 17,5 gpm
Temperatura de Entrada	entre 73°C y 76°C
Temperatura de Salida	entre 44,6°C y 45,7°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,26 m ³ /minuto y 2,3 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.178 gramos de producto.

[234] Aspersión 3: 1.178 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.127 gramos de una solución acuosa que contenía 78 gramos (5,4% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), 78 gramos (5,4% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), 20 gramos

(1,35% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400) y 20 gramos (1,35% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	5,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a 12,2 gpm durante 30 minutos. Mantenido a 12,2 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	70°C, incrementada a 76°C después de 15 minutos
Temperatura de Salida	entre 51,0°C y 52,5°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,28 m ³ /minuto y 2,38 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 275,6 kPa y 289,4 kPa

Se recolectaron 1.356 gramos de producto.

[235] Aspersión 4: 1.356 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 3 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 67,0 gramos de una solución acuosa que contenía 3 gramos (0,22% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	17,0 gpm durante toda la aspersión 4
Temperatura de Entrada	76°C
Temperatura de Salida	entre 44,0°C y 46,5°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,28 m ³ /minuto y 2,31 m ³ /minuto

Se recolectaron 1.359 gramos de producto final.

[236] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos

fue de 1,03 mg/almohada.

Ejemplo 8

Preparación de Concentrado de Enzima con Precipitados y Formulación Granular

Preparación de Concentrado de Enzima con Enzima Precipitada

[237] Se agregó sulfato de sodio en una concentración del 12% (w/v) al concentrado de enzima final después de la ultrafiltración en el Ejemplo 7, para inducir la precipitación. El concentrado con sulfato de sodio se mezcló a 10 °C durante 18 horas. La suspensión resultante se utilizó para granulación.

Formulación Granular

[238] Se preparó una composición granular del concentrado de enzima que contenía la enzima precipitada en la siguiente forma.

[239] **Aspersión 1:** 500 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 µm a 350 µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 999 gramos de solución que contenía una proteasa activa, 0,7% de talco (Nytal 400), 0,9% antiespumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), y 0,5% de alcohol polivinílico (5/88 from Erkol), se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	4,5 gpm (gramos por minuto), incrementando a 10,6 gpm durante 30 minutos
Temperatura de Entrada	entre 69,0°C y 74,0°C
Temperatura de Salida	entre 44,5°C y 47,1°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,26 m ³ /minuto y 2,33 m ³ /minuto
Presión de Aire	213,6 kPa, incrementando a 275,6 kPa durante 60

de Atomización minutos.

Se recolectaron 705 gramos de producto.

[240] Aspersión 2: 705 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.847 gramos de una solución acuosa que contenía 369 gramos de sulfato de sodio (27,7 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima.

Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 15,2 gpm (gramos por minuto) y 18,2 gpm
Temperatura de Entrada	entre 70°C y 78°C
Temperatura de Salida	entre 42,9°C y 45,1°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,27 m ³ /minuto y 2,30 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.061 gramos de producto.

[241] Aspersión 3: 1.061 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.000 gramos de una solución acuosa que contenía 72 gramos (5,4% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), 72 gramos (5,4% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), 18 gramos (1,35% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400) y 18 gramos (1,35% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros de recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	3,8 gpm (gramos por minuto), incrementando a 9,9 gpm durante 60 minutos. Mantenido a 9,9 gpm
----------------------------------	--

	durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	72°C, incrementada a 84°C después de 15 minutos
Temperatura de Salida	entre 51,4°C y 52,9°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,26 m ³ /minuto y 2,33 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 275,6 kPa y 289,4 kPa

Se recolectaron 1.226 gramos de producto.

[242] Aspersión 4: 1.226 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 3 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 62,0 gramos de una solución acuosa que contenía 3 gramos (0,22% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	17,0 gpm durante toda la aspersión 4
Temperatura de Entrada	69°C
Temperatura de Salida	entre 41,4°C y 42,3°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,29 m ³ /minuto y 2,28 m ³ /minuto

Se recolectaron 1.228 gramos de producto final.

[243] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 2,50 mg/almohada.

Ejemplo 9

Preparación de Caldo Bacteriano Lisado con Precipitados de Enzima y Formulación Granular

Preparación de Lisado de Caldo Bacteriano con Enzima Precipitada

[244] *Bacillus subtilis*, que expresa la proteasa subtilisina como se describe en el Ejemplo 7, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la

fermentación, el caldo contenía en su mayor parte la enzima subtilisina soluble. Se agregó lisozima al caldo en una concentración de 1 % y se mantuvo a 37 °C durante 3 horas. El lisado resultante, que contenía enzima soluble y enzima insoluble, contenía 57 g/mL de actividad y 18,23% de sólidos secos.

Formulación Granular

[245] Se preparó una composición granular del lisado con enzima precipitada en la siguiente forma.

[246] **Aspersión 1:** 585 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 µm a 350 µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 993 gramos de solución que contenía una proteasa activa, 0,7% de talco (Nytal 400), 0,9% de anti-espumante (Foamblast 882 de Emerald Performance Materials), y 0,5% de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión	4,5 gpm (gramos por minuto), incrementando a
de la Solución	12,5 gpm durante 2 horas
Temperatura de Entrada	entre 63°C y 70°C
Temperatura de Salida	entre 43,0°C y 47,5°C
Flujo del Aire	entre 2,25 m ³ /minuto y 2,3 m ³ /minuto
de Fluidización	
Presión de Aire	213,6 kPa, incrementando a 261,8 kPa durante 30
de Atomización	minutos.

Se recolectaron 785 gramos de producto.

[247] **Aspersión 2:** 785 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 2.001 gramos de una solución acuosa que contenía 400 gramos de sulfato de sodio (27,7 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión

fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 15,2 gpm (gramos por minuto) y 21,2 gpm
Temperatura de Entrada	entre 65°C y 78°C
Temperatura de Salida	entre 44,1°C y 45,6°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,22 m ³ /minuto y 2,31 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 268,7 kPa y 275,6 kPa

Se recolectaron 1.168 gramos de producto.

[248] Aspersión 3: 1.168 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 1.083 gramos de una solución acuosa que contenía 78 gramos (5,4% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), 78 gramos (5,4% de la composición de gránulos) de dióxido de titanio (R902 de DuPont), 20 gramos (1,35% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400) y 20 gramos (1,35% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	3,0 gpm (gramos por minuto), incrementando a 8,0 gpm durante 60 minutos. Mantenido a 8,0 gpm durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	73°C, incrementada a 78°C después de 30 minutos
Temperatura de Salida	entre 52,0°C y 52,9°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,27 m ³ /minuto y 2,37 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	entre 276,5 kPa y 289,38 kPa

Se recolectaron 1.347 gramos de producto.

[249] Aspersión 4: 1.347 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 3 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 67,0 gramos de una solución acuosa que contenía 3 gramos (0,22% de la composición de gránulos) de Neodol (23-6.5 de Shell Chemicals) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	12,6 gpm durante toda la aspersión 4
Temperatura de Entrada	63°C
Temperatura de Salida	entre 41,1°C y 44,1°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,29 m ³ /minuto y 2,31 m ³ /minuto

Se recolectaron 1.349 gramos de producto final.

[250] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 1,4 mg/almohada.

Ejemplo 10

Preparación de Concentrado de Caldo Fúngico con Enzima Soluble y Formulación Granular

Preparación de Caldo de Fermentación Fúngico Concentrado con Enzima Soluble

[251] *Trichoderma reesei*, que expresa glucoamilasa, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía en su mayor parte la enzima gluco-amilasa soluble. Se midió la actividad de la glucoamilasa como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 7,262,041. Las células se extrajeron por microfiltración, como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2007/0246406. El caldo clarificado se concentró 10x usando una membrana de espiral PES MWCO de 10K. El concentrado de enzima se almacenó a 10°C hasta su utilización. Luego del

almacenamiento, se formaron precipitados. Se extrajeron los precipitados por centrifugación (10.000 g, 20 minutos, 10°C). El sobrenadante claro resultante se usó para la preparación de una composición granular, como se describe a continuación.

Formulación Granular

[252] Se preparó una composición granular de la enzima soluble en caldo de fermentación fúngico en la siguiente forma.

[253] **Aspersión 1:** 466 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 µm a 350 µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 y se fluidizaron. A esto, 512 gramos de solución que contenía una amilasa activa, 5% de almidón de maíz (Cargill Foods) y 1% de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	8,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a 10,1 gpm durante 15 minutos. Para el resto del experimento se mantuvieron 10,1 gpm.
Temperatura de Entrada	entre 71°C y 77°C
Temperatura de Salida	entre 46,7°C y 49,1°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,08 m³/minuto y 2,28 m³/minuto
Presión de Aire de Atomización	213,6 kPa, incrementando a 282,5 kPa durante 45 minutos.

Se recolectaron 615 gramos de producto.

[254] **Aspersión 2:** 615 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 2.667 gramos de una solución acuosa que contenía 533 gramos de sulfato de sodio (40 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los

siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 15,4 gpm (gramos por minuto) y 18,5 gpm
Temperatura de Entrada	entre 72°C y 78°C
Temperatura de Salida	entre 43,8°C y 45,7°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,26 m ³ /minuto y 2,34 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	265,2 kPa

Se recolectaron 1.113 gramos de producto.

[255] Aspersión 3: 1.113 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 667 gramos de una solución acuosa que contenía 40 gramos (3% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol) y 80 gramos (6% de la composición de gránulos) de talco (Nytal 400) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	4,6 gpm (gramos por minuto), incrementando a 11,0 gpm durante 60 minutos.
Temperatura de Entrada	68°C, incrementada a 82°C después de 10 minutos
Temperatura de Salida	entre 44,2°C y 52,4°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,33 m ³ /minuto y 2,36 m ³ /minuto
Presión de Aire de Atomización	275,6 kPa

Se recolectaron 1.221 gramos de producto final.

[256] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 1,66 mg/almohada.

Ejemplo 11
Preparación de Caldo Fúngico con Precipitados de Enzima y Formulación
Granular

[257] *Trichoderma reseei*, que expresa gluco-amilasa, como se describe en el Ejemplo 10, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo contenía en su mayor parte la enzima gluco-amilasa soluble. Las células se eliminaron sin lisis, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,801,034. El precipitado obtenido de centrifugar el concentrado de enzima del Ejemplo 10 se agregó al caldo con células eliminadas. El caldo resultante contenía enzima soluble e insoluble. El caldo con contenido de enzima exhibió una actividad de 447 U/mL y 19,7% (w/w) de sólidos secos. La cantidad de precipitado presente se determinó midiendo la actividad de la muestra entera, y el sobrenadante (14.000 rpm, 5 minutos). Los datos se recopilan en la siguiente Tabla 1. 90% de la actividad estaba presente en el sobrenadante (como enzima soluble) y 10% estaba presente en forma precipitada.

TABLA 1

	Peso (g)	Actividad (GAU/ml)	Actividad Total (x10³ GAU)
Caldo + Ppt	200	447,2	89,440
Sobrenadante	181	445,9	80,708

Formulación Granular

[258] Se preparó una composición granular del caldo fúngico que contenía enzima precipitada en la siguiente forma.

[259] **Aspersión 1:** 472 gramos de cristales de sulfato de sodio (Saltec), con un intervalo de tamaño de un diámetro de partícula de 150 µm a 350 µm, se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FI-1 fluid y se fluidizaron. A esto, 494 gramos de solución que contenía una amilasa activa, 5% de almidón de maíz (Cargill Foods) y 1% de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol), se aplicaron por aspersión sobre los cristales de sulfato de sodio. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	8,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a 10,8 gpm durante 10 minutos. 10,8 gpm se mantuvieron durante el resto del experimento.
Temperatura de Entrada	entre 68°C y 71°C
Temperatura de Salida	entre 44,7°C y 46,5°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,22 m³/minuto y 2,24 m³/minuto
Presión de Aire de Atomización	227,4 kPa, incrementando a 275,6 kPa durante 20 minutos.

Se recolectaron 612 gramos de producto.

[260] Aspersión 2: 612 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 1 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 2.667 gramos de una solución acuosa que contenía 533 gramos de sulfato de sodio (40 % de la composición de gránulos) se recubrieron entonces por aspersión sobre los gránulos de la enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión de la Solución	entre 17,2 gpm (gramos por minuto) y 23,4 gpm
Temperatura de Entrada	entre 74°C y 82°C
Temperatura de Salida	entre 44,6°C y 45,5°C
Flujo del Aire de Fluidización	entre 2,3 m³/minuto y 2,32 m³/minuto
Presión de Aire de Atomización	261,8 kPa

Se recolectaron 1.081 gramos de producto.

[261] Aspersión 3: 1.081 gramos de los gránulos de enzima de la aspersión 2 se cargaron en un recubridor de lecho fluidizado Vector FL-1 y se fluidizaron. 667 gramos de una solución acuosa que contenía 40 gramos (3% de la composición de gránulos) de alcohol polivinílico (5/88 de Erkol) y 80 gramos (6% de la

composición de gránulos) de talco (Nytal 400) se aplicaron entonces por aspersión sobre los gránulos de enzima. Los parámetros del recubrimiento por aspersión fueron los siguientes:

Tasa de Aspersión	7,2 gpm (gramos por minuto), incrementando a
de la Solución	10,8 gpm durante 60 minutos.
Temperatura de Entrada	78°C, incrementada a 81°C durante 60 minutos
Temperatura de Salida	entre 52,7°C y 53,1°C
Flujo del Aire	entre 2,35 m ³ /minuto y 2,36 m ³ /minuto
de Fluidización	
Presión de Aire	282,5 kPa
de Atomización	

Se recolectaron 1.190 gramos de producto final.

[262] Usando el ensayo de desgaste por rozamiento de Heubach, se analizaron los gránulos para detectar la presencia de polvo. El nivel de polvo de los gránulos fue de 7,9 mg/almohada.

Ejemplo 12

Estabilidad Enzimática en Detergente para Gránulos Preparados de Concentrado que contenía Componentes Celulares y Enzima Insoluble

[263] Se evaluó la estabilidad de los gránulos de enzima preparados como se describe en el Ejemplo 4 en varias bases detergentes: Calgonite 5-1, WFK con Citrato, WFK con Fosfato, y Somat (Henkel). Las bases de detergente WFK se obtienen de wfk Testgewebe GmbH (www.testgewebe.de). Los gránulos de enzima en detergente (2% w/w) se mantuvieron a 22°C en recipientes cerrados. Se midió la actividad de la enzima residual luego de un tiempo de almacenamiento de 0, 5 semanas, 2 meses y 4 meses. Los datos se recopilan en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2
Estabilidad del Gránulo de Enzima en Detergente

Base Detergente	Día 0	5 Semanas	2 Meses	4 Meses
Calgonite 5-1	100%	98%	93%	96%
WFK con Citrato	100%	100%	94%	96%
WFK con Fosfato	100%	100%	96%	100%
Somat	100%	89%	89%	98%

Ejemplo 13

**Rendimiento de la Aplicación de Gránulos Preparados de Concentrado que
contenía Componentes Celulares y Enzima Insoluble**

[264] Se evaluó el rendimiento de lavado de gránulos de enzima, preparados como se describe en el Ejemplo 4, antes y después del almacenamiento IEC A*, que contenía base detergente blanqueadora. Las muestras se almacenaron en vasos abiertos durante 1 semana a 37°C/70% de humedad relativa (RH - *relative humidity*). Los ensayos de aplicación con gránulos frescos y detergente fresco y con gránulos almacenados en detergente durante 1 semana se llevaron a cabo usando varias manchas: CS-26 (almidón de maíz sobre algodón), CS-27 (almidón de papa sobre algodón), CS-28 (almidón de arroz sobre algodón), CS-29 (almidón de yuca sobre algodón), y EMPA-161 (almidón sobre algodón).

Ensayo de Lavado

[265] El ensayo de lavado se realizó en una lavadora Miele Novotronic W822: programa "Normal"/"Cotton", temperatura 40°C, dureza del agua 8,5 GH. Detergente: IEC A* con blanqueador: dosificación 8 g/L (=136 g/lavado), incluyendo 0,15 g Purafect 4000 E (disponible de Genencor Division of Danisco US Inc.) y 0,139 g de gránulos del Ejemplo 4.

Mediciones del Rendimiento

[266] Se hicieron mediciones con un Colorímetro Minolta CR300: CIELAB L*ab Scale, D65 Standard Illuminate, sin filtro UV, fondo blanco. La eliminación de suciedad (SR - *soil removal*) se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta E_{\text{después del lavado}} - \Delta E_{\text{antes del lavado}}}{\Delta E_{\text{muestra de tela limpia}} - \Delta E_{\text{antes del lavado}}} \times 100 = \%SR$$

en donde:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

[267] Figura 1 muestra que el rendimiento del ensayo de los gránulos del Ejemplo 4 permaneció sin modificación luego del almacenamiento.

Ejemplo 14
Estabilidad Enzimática Durante el Almacenamiento para Gránulos
Preparados de Concentrado que contenía Componentes Celulares y Enzima
Insoluble

[268] Gránulos de enzima, preparados como se describe en el Ejemplos 7-9, se evaluaron con respecto a la estabilidad de almacenamiento. Las condiciones utilizadas fueron una cámara 37°C en 70% de Humedad Relativa con muestras puestas en recipientes abiertos. Se cuantificó la actividad residual y se calculó basándose en la actividad inicial. Estos datos se recopilan en la siguiente Tabla 3.

TABLA 3

Muestra	Tiempo (días)				
	0	3	5	7	14
Ejemplo #7 (Gránulo de Enzima Soluble)	100%	96%	97%	100%	91%
Ejemplo #8 (Gránulo de Enzima Precipitada)	100%	108%	109%	108%	109%
Ejemplo #9 (Gránulo de Lisado de Enzima Precipitada)	100%	96%	95%	99%	96%

Ejemplo 15
Comparación de las Propiedades de los Procedimientos de
Recuperación Descritos en los Ejemplos 1-5

[269] La actividad y pureza de la α-amilasa, recuperada como se describe en los

anteriores Ejemplos 1-5, se presenta en la Tabla 4. La pureza de la enzima se calculó dividiendo la actividad de la enzima por la cantidad total de sólidos secos.

Tabla 4 Propiedades del Concentrado de Lisado de Enzima

Ejemplo	Pureza de la Enzima por Sólidos Secos	Rendi- miento (%)	Desechos Relativos	Purificación Relativa al Lisado Inicial	Rendimiento Relativo al Ejemplo 1	Purificación Relativa al Ejemplo 1
1	4,3	5%	0	0,6	1,0	1,0
2	22,1	84%	3% (glucosa)	2,1	16,8	5,1
4	9,3	86%	0	1,4	17,1	2,2
5	17,2	95%	0	1,7	19,0	4,0

Ejemplo 16

Estabilidad Enzimática Durante el Almacenamiento en Base Detergente con Blanqueador para Gránulos Preparados de Concentrado que contenía Componentes Celulares y Enzima Insoluble

[270] Gránulos de enzima, preparados como se describe en el Ejemplos 1, 2, 4 y 6, se evaluaron con respecto a su Estabilidad de Almacenamiento en una base detergente IEC A* con polvo blanqueador. El detergente en polvo IEC A* se adquirió de WFK y no contiene agentes blanqueadores. Se agregó el siguiente sistema blanqueador: 3 % TEAD, y 20% de perborato.2H₂O. Las condiciones de almacenamiento utilizadas fueron 37°C en una cámara con 70% de Humedad Relativa con muestras puestas en recipientes de polipropileno abiertos. Se cuantificó la actividad residual y se calculó basándose en la actividad inicial. Los datos se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 17

Preparación de Solución de Enzima Clarificada de Caldo de Fermentación que contenía Cristales de Enzima

[271] Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

92

Material de Partida

[272] Una cepa de *Trichoderma reesei*, manipulada por técnicas de ingeniería genética para expresar una proteasa aspártica, se fermentó bajo condiciones estándar conocidas en el arte. Por ejemplo, véase Patente de los Estados Unidos No. 7,429,476. El pH del caldo de fermentación al momento de recolectar fue de 4,62, y la enzima había formado grandes cristales con 98% de la actividad total en el concentrado final ("*spindown*").

Filtración 1 – Recuperación de Cristales de Proteasa

[273] 521 g de caldo recolectado se mezcló en un vaso de pico con 63 g de auxiliar de filtro de tierra de diatomeas, Celatom FW-6. Se filtraron 302 g de la mezcla a través de una membrana filtrante de nylon de 0,45 μm (Nalgene 154-0045). Se recuperaron 155 g de filtrado y 146 g de las sustancias retenidas en el filtro ("*filter cake*"). Se conservó el 98% de la actividad de la enzima en las sustancias retenidas en el filtro. El filtrado se descartó.

Solubilización de Cristales

[274] 131 g de las sustancias retenidas en el filtro del paso anterior se transfirieron a un vaso de pico y se mezclaron con 87 g de 50 mM de ácido sulfúrico. Luego de reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente, la mezcla tenía un pH de 3,2, y un microscopio confirmó que todos los cristales de proteasa se habían disuelto.

Filtración 2 – Clarificación de la Solución de Proteasa

[275] 184 g de la mezcla de solubilización de cristales del paso anterior se filtraron en el mismo tipo de filtro utilizado en la filtración 1. El filtrado se desplazó de los sólidos sedimentados eliminando con 50 g de agua cuando la superficie de las sustancias retenidas en el filtro se secaron. Se recolectaron 154 g de filtrado, y se descartaron 80 g de las sustancias retenidas en el filtro. El filtrado claro contenía 88% de la actividad de la enzima inicial con una concentración volumétrica que resultó 16 % más alta que la del caldo de partida.

Ejemplo 18

Preparaciones de Formulación de Enzima Clarificada

Material de Partida: Caldo de Fermentación Bacteriano

[276] *Bacillus licheniformis*, que expresa en forma recombinante la enzima α -amilasa, se fermentó usando técnicas bien conocidas en el arte. Luego de la fermentación, el caldo se lisó usando 0,01% (w/w) de lisozima durante 2 horas, seguido por tratamiento térmico a 60°C durante 2 horas.

18.1 Preparación de Caldo que contenía Enzima Soluble (recuperación convencional)

[277] 5g de material de partida se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida de la fase líquida. El sobrenadante contenía 88% de la actividad de la enzima. La pureza por sólidos secos fue de 6%. La pureza por proteína total fue de 14%.

18.2 Preparación de Caldo que contenía Enzima Insoluble

Cristalización de la Enzima α -Amilasa en Lisado

[278] Se utilizaron 40g del material de partida. Se ajustó el pH del lisado a 5 usando 20% de ácido acético. El pH ajustado se incubó en un agitador: 50°C y agitación a 80 rpm.

Centrifugación #1 – Recuperación de Cristales de α -Amilasa y Residuos Celulares

[279] Luego de 44 horas de incubación, se centrifugaron 5 g de lisado a 14.000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida de la fase líquida.

Solubilización de Cristales de α -Amilasa

[280] Los sólidos recuperados se resuspendieron en agua de la llave para alcanzar el peso del lisado original de 5 g. Se agregaron 3 g de propilen glicol a la

suspensión. Se ajustó el pH a 6,5 usando 5% NaOH y se mezcló por inversión a temperatura ambiente durante 18 horas. A continuación la mezcla se incubó a 40°C durante 2 horas.

Centrifugación #2 – Clarificación de Soluciones de Amilasa

[281] La mezcla de solubilización de cristales se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida de la fase líquida. El concentrado resultante (sobrenadante líquido) se clarificó posteriormente usando un filtro de jeringa de 0,45µm. La solución de amilasa clara contenía 85% de la actividad hallada en el lisado inicial usado para cristalización. La pureza de los sólidos secos fue de 42%. La pureza por proteína total fue de 34%.

18.3 Preparación de Caldo que contenía Enzima Insoluble Usando Floculación

Floculación

[282] Se agregaron 10g/L de polímero catiónico C581 a 5 g de lisado, que contenía cristales disueltos de α-amilasa del Ejemplo 18.2, y luego se mezclaron suavemente por inversiones manuales 10 veces.

Centrifugación #2 – Clarificación de Soluciones de Amilasa

[283] La mezcla de solubilización de cristales floculados se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida de la fase líquida. El concentrado claro contenía 85% de la actividad hallada en el lisado inicial utilizado para cristalización. La pureza por proteína total fue de 39%.

[284] Las purezas de soluciones de α-amilasa recuperada como se describe en los Ejemplos 18.1, 18.2, y 18.3 se presentan en la Tabla 5. La pureza de la enzima se calculó dividiendo la actividad de la enzima por la cantidad total de sólidos secos, o dividiendo por la concentración de proteína total.

Ejemplo	Pureza de la Enzima por Sólidos Secos	Purificación Relativa al Ejemplo 18.1	Pureza de la Enzima por Proteína Total	Purificación Relativa al Ejemplo 18.1
18.1	6%	1,0	14%	1,0
18.2	42%*	7,4	34%	2,4
18.3			39%	2,7

* excluyendo la contribución por propilen glicol

[285] Aunque la anterior invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y de ejemplos con fines de claridad para su comprensión, será evidente a las personas expertas en el arte que pueden ponerse en práctica ciertos cambios y modificaciones, sin apartarse del espíritu y el ámbito de la invención. Por consiguiente, la descripción no debe interpretarse como limitante del ámbito de la invención.

[286] Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en esta especificación se incorporan por este medio por referencia en su totalidad para todos los propósitos y en la misma medida en que si se indicara que cada publicación individual, patente, o solicitud de patente se incorporaran específica e individualmente por referencia.

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Un método para recuperar una enzima insoluble de un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares de células microbianas, comprendiendo el citado método recuperar enzima insoluble del caldo microbiano sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición con contenido de enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citado caldo microbiano se produce por un método seleccionado de:

mezclar una enzima con un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares, en donde la citada enzima no se produce por las citadas células microbianas, y en donde la citada enzima es insoluble en el citado caldo microbiano o en donde la citada enzima es soluble en el citado caldo microbiano, y el citado método comprende además hacer insoluble por lo menos parte de la citada enzima por adición de un precipitante;

agregar un precipitante a un caldo microbiano que contiene una enzima soluble expresada por las citadas células microbianas, haciendo así que por lo menos algo de la enzima se vuelva insoluble; y

expresar una enzima en células microbianas en un medio de fermentación, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el medio de fermentación.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citado recuperar comprende por lo menos una operación de recuperación seleccionada de acondicionamiento del caldo; lisis de células; homogeneización; diafiltración; y separación sólido-líquido,

en donde, cuando el citado recuperar comprende que se realicen dos o más de las citadas operaciones de recuperación, las citadas operaciones de recuperación pueden llevarse a cabo en cualquier orden.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citado recuperar comprende extraer por lo menos parte de la fase líquida del caldo microbiano.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde extraer por lo menos parte de la fase líquida del caldo microbiano comprende concentrar el caldo microbiano.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde concentrar el caldo microbiano comprende un proceso de filtración de membrana seleccionado de ultrafiltración, microfiltración, ósmosis inversa, y nanofiltración.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde extraer por lo menos parte de la fase líquida del caldo microbiano comprende un proceso seleccionado de filtración con tambor rotatorio en vacío, filtración de placa y marco, filtración de cinta continua, centrifugación, separación ciclónica, decantación, y evaporación.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la citada enzima insoluble se produce agregando un precipitante a un caldo microbiano, que contiene una enzima soluble, haciendo así insoluble por lo menos algo de la enzima en el caldo microbiano, en donde el precipitante se selecciona de ajuste de pH, ajuste de temperatura, adición de sal, adición de ácido, adición de base, adición de por lo menos una otra proteína, adición de un amortiguador, y adición de un polielectrólito, o una combinación de los anteriores.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición que contiene enzima insoluble recuperada incluye células microbianas intactas.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las células microbianas intactas son células microbianas vivas.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las células microbianas intactas son células microbianas muertas.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citado caldo microbiano, que contiene células microbianas y/o residuos celulares, incluye un lisado de células microbianas, en donde el citado lisado de células microbianas se produce rompiendo membranas de células microbianas.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el método comprende además romper membranas de células microbianas de las células microbianas intactas para producir un lisado de células microbianas, que contiene la enzima insoluble recuperada.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde romper membranas de células microbianas comprende contactar células microbianas con una enzima que es capaz de lisis de células microbianas.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enzima que es capaz de lisis de células microbianas es una enzima lisozima.
16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en donde romper membranas de células microbianas comprende un proceso mecánico de cizalladura seleccionado de homogeneización; mezclado de alta cizalladura; extrusión a presión; y bombeo de alta cizalladura.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, que comprende además homogeneizar el lisado de células microbianas para producir un lisado de células microbianas homogeneizado.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además diafiltrar el lisado de células microbianas.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células microbianas son células bacterianas.
20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde las células bacterianas son células *Bacillus*.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde las células *Bacillus* son células *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células microbianas son células fúngicas.
23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde las células fúngicas son células *Trichoderma*.
24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde las células *Trichoderma* son células *Trichoderma reesei*.
25. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde por lo menos alrededor de 10% de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.
26. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pureza de la enzima insoluble se incrementa en por lo menos alrededor de 10% en comparación con la pureza de la enzima insoluble antes del citado recuperar.
27. Una composición producida de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en donde la citada composición contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares.
28. Una composición de acuerdo con la reivindicación 27, que contiene además por lo menos un ingrediente de formulación.
29. Un método para producir solución de enzima líquida clarificada, el cual comprende
- (a) proveer una composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares;
 - (b) solubilizar por lo menos parte de la enzima insoluble agregando una o más sustancias que disuelven la enzima y/o cambiando las condiciones físicas de manera que la enzima se disuelva por lo menos parcialmente, produciendo así una solución de enzima soluble; y extraer los sólidos de la solución preparada de acuerdo con el paso (b), produciendo así una solución de enzima líquida clarificada.
30. Un método de elaborar una formulación granular que contiene enzima, el cual comprende producir un gránulo, que contiene enzima, que incluye una

composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares.

31. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la citada composición, que incluye la enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.

32. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el gránulo que contiene la enzima se produce por un proceso de granulación seleccionado de procesamiento de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior; procesamiento con recubridor Wuster con aspersión inferior; granulación de alta cizalladura; extrusión; y recubrimiento en bombo.

33. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, el cual comprende aplicar una capa, que contiene enzima, que incluye la citada enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares sobre un núcleo en un procesador de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior, en donde el citado método comprende opcionalmente aplicar una capa de sal entre el citado núcleo y la citada capa que contiene enzima.

34. Un método de acuerdo con la reivindicación 33, que comprende además aplicar una capa que contiene una sal de barrera sobre la citada capa que contiene enzima.

35. Un método de acuerdo con la reivindicación 34, que comprende además aplicar una capa recubridora externa, que contiene un polímero y/o pigmento, sobre la citada capa de sal de barrera.

36. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el citado gránulo, que contiene enzima, se produce aplicando una capa de sal de barrera y/o una o más capas recubridoras sobre un núcleo, que contiene enzima, el cual incluye la citada enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares.

37. Un método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el citado núcleo, que contiene enzima, se produce por procesamiento de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior.
38. Un método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el citado núcleo, que contiene enzima, se produce por granulación de alta cizalladura.
39. Un gránulo que contiene enzima, el cual incluye:
un núcleo;
opcionalmente, una capa de sal aplicada sobre el núcleo; y
una capa, que contiene enzima, aplicada sobre el núcleo o capa de sal, en donde la citada capa, que contiene enzima, incluye una composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares.
40. Un gránulo, que contiene enzima, de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la citada composición que incluye enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano, que contiene células microbianas y/o residuos celulares, sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.
41. Un gránulo, que contiene enzima, de acuerdo con la reivindicación 39, que incluye además una capa de sal de barrera aplicada sobre la citada capa que contiene enzima.
42. Un gránulo, que contiene enzima, de acuerdo con la reivindicación 39, que incluye además una capa recubridora externa aplicada sobre la citada capa de sal de barrera, en donde la citada capa recubridora externa contiene un polímero y/o pigmento.
43. Un gránulo, que contiene enzima, el cual está constituido por un núcleo, que contiene enzima, y una capa de sal de barrera y/o una o más capas recubridoras que rodean el núcleo, en donde el citado núcleo incluye una composición que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares.

44. Un gránulo, que contiene enzima, de acuerdo con la reivindicación 43, en donde la citada composición, que contiene enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano que contiene células microbianas y/o residuos celulares, sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.

45. Un gránulo, que contiene enzima, de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el citado núcleo que contiene enzima se produce por procesamiento de lecho fluidizado por aspersión en la parte superior.

46. Un gránulo, que contiene enzima, de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el citado núcleo que contiene enzima se produce por granulación de alta cizalladura.

47. Una composición detergente que incluye el gránulo, que contiene enzima, de cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46.

48. Una composición para procesamiento de textiles que incluye el gránulo, que contiene enzima, de cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46.

49. Una composición de forraje para animales que incluye el gránulo, que contiene enzima, de cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46.

50. Una composición alimenticia que incluye el gránulo, que contiene enzima, de cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46.

51. Una formulación líquida, que contiene enzima, que incluye una composición que contiene una enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares.

52. Una formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 51, en donde la citada composición, que incluye enzima insoluble y células microbianas y/o residuos celulares, se produce por un método que comprende recuperar enzima insoluble de un caldo microbiano, sin extraer las células microbianas y/o residuos celulares, produciendo así una composición que contiene enzima insoluble

recuperada y células microbianas y/o residuos celulares, en donde por lo menos algo de la enzima es insoluble en el caldo microbiano.

53. Una formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 51, que incluye además uno o más ingredientes de formulación seleccionados de un poliol; una sal; un preservante; un tensoactivo; y un antioxidante.

FIGURA 1

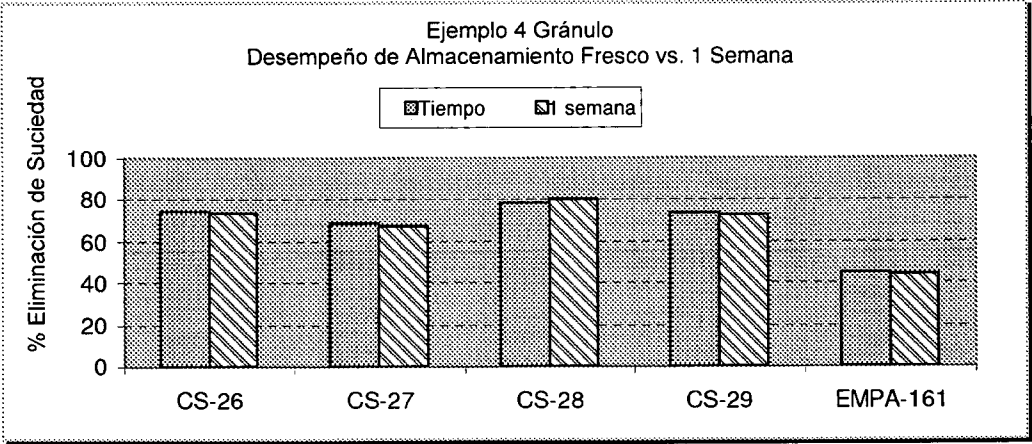
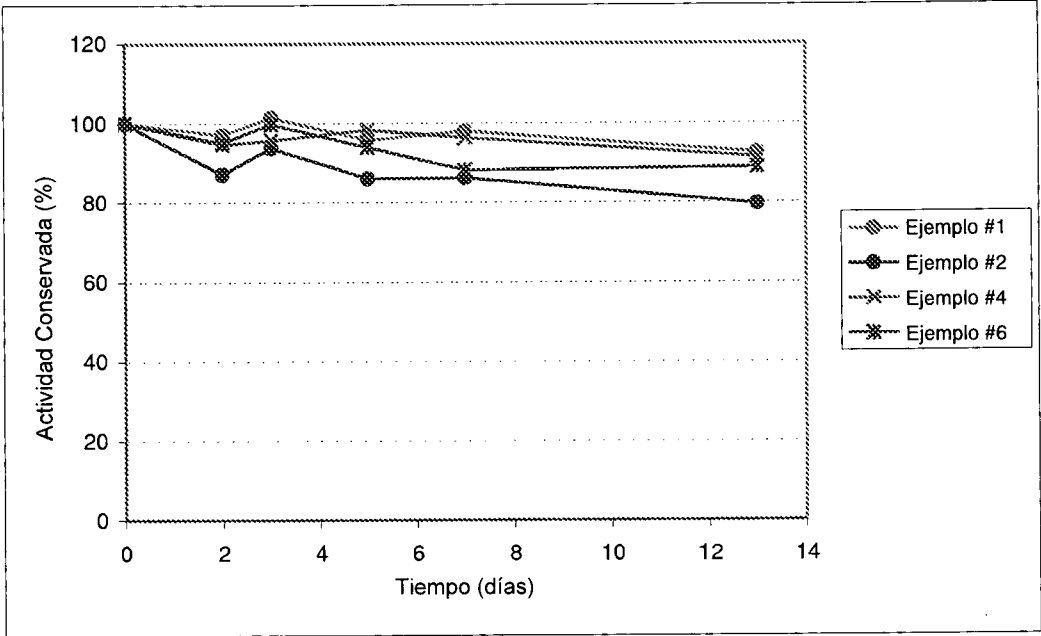


FIGURA 2



(43) International Publication Date
17 December 2009 (17.12.2009)



(10) International Publication Number
WO 2009/152176 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/435 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2009/046783

(22) International Filing Date:

9 June 2009 (09.06.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/060,087 9 June 2008 (09.06.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **DANISCO US INC., GENENCOR DIVISION** [US/US]; 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BODO, Michael** [AT/US]; Danisco US Inc., Genencor Division, 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304 (US). **CHRISTENSEN, Robert, I.** [US/US]; Danisco US Inc., Genencor Division, 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304 (US). **DHALIWAL, Rajdeep, S.** [US/US]; Danisco US Inc., Genencor Division, 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304 (US). **HENG, Meng, H.** [MY/US]; Danisco US Inc., Genencor Division, 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304 (US).

(74) Agent: **JACOBSON, Jill, A.**; Danisco US Inc., Genencor Division, 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

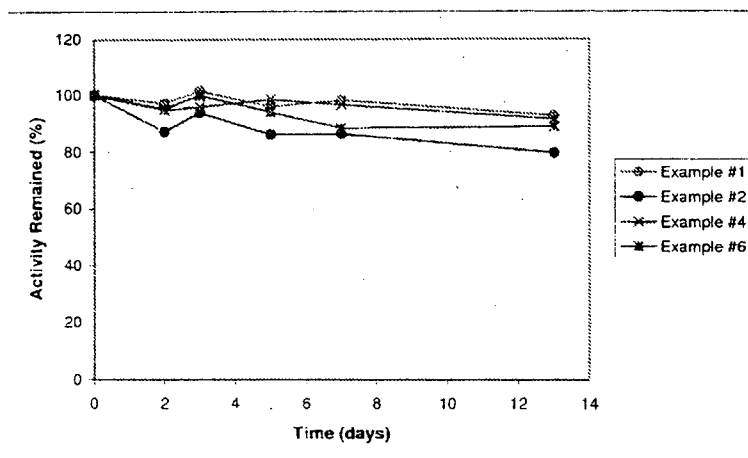
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: RECOVERY OF INSOLUBLE ENZYME FROM FERMENTATION BROTH AND FORMULATION OF INSOLUBLE ENZYME

FIGURE 2



(57) Abstract: Methods are provided for recovery and formulation of insoluble enzymes from a microbial fermentation broth, without removal of microbial cells or cell debris. Granular and liquid formulations comprising insoluble enzymes are also provided.

WO 2009/152176 A2

RECOVERY OF INSOLUBLE ENZYME FROM FERMENTATION BROTH AND FORMULATION OF INSOLUBLE ENZYME

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

- 5 [01] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 61/060,087, filed on June 9, 2008, which is incorporated by reference herein in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

- 10 [02] The invention relates to methods for recovering one or more enzymes of interest from a microbial fermentation broth in the presence of microbial cells or cell debris, and solid and liquid formulations prepared from a composition containing recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris.

BACKGROUND

- 15 [03] Conventional recovery of enzymes from microbial fermentation broth for industrial uses in liquid or solid product forms typically involves several processing steps. Most conventional recovery processes include four similar steps which occur sequentially: removal of non-product insoluble components of microbial broth; isolation of products; purification; and polishing. (See, e.g., *Enzymes in Industry: Production and Applications* (2007) Wolfgang
20 Aehle, ed., 3rd edition, Wiley-VCH, p. 49; *Bioseparations: Science and Engineering* (2003) R.G. Harrison, P. Todd, S.R. Rudge, D.P. Petrides, Oxford University Press, p. 32.) For example, recovery and formulation of an intracellularly produced enzyme generally includes the following processing steps: (1) cell lysis; (2) pretreatment; (3) cell separation; (4) concentration; and (5) formulation – (a) chemical addition for liquid stabilization, followed by polish filtration; or (b)
25 chemical addition for solid stabilization, followed by drying.

- [04] Cell lysis releases the enzyme(s) of interest from the cells by breaking the cell walls. Cell lysis may be achieved by contacting the cells with an enzyme that degrades cell walls such as lysozyme, by inducing fermentation environment changes such as alteration in pH, temperature, dissolved oxygen concentration, glucose concentration, salt concentration, or
30 concentration of other additives to cause spontaneous lysis, by mechanical disruption of the cell wall such as by homogenization, or by a combination of these methods. For enzyme expressed extracellularly (secreted into the culture medium), cell lysis is optional. (See, e.g., *Isolation and*

Purification of Proteins (2003) R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson, ed., Marcell Dekker, Inc., pp. 1-27.)

[05] A cell separation step is employed after cell lysis to produce a clarified solution containing the enzyme(s) of interest. Typically, cell separation involves centrifugation and/or filtration, to remove cell debris and any insoluble material produced during and/or after fermentation, and/or as a result of cell lysis. Suitable centrifugation methods include disk stack or decanter centrifugation. Suitable filtration methods include rotary vacuum filtration, filtration through a plate-and-frame filter press, or filtration through a membrane micro-filter.

[06] Cell separation using centrifugation is often a compromise between clarity and throughput. It is common practice to use high throughput centrifugation and then remove trace amounts of suspended solids in amounts sufficient to interfere with subsequent processing steps via high throughput filtration. Most filtration methods in practice today require the use of processing aids such as diatomaceous earth or the like and carbon (PCT Application No. WO01/87468) to achieve separation efficiency. Diatomaceous earth improves filtration process throughput and filtrate clarity.

[07] A pretreatment step is typically employed before physical separation of cells or cell debris from the liquid containing the enzyme(s) of interest. Separating cell debris without such a step is generally non-economical and time consuming due to the small particle size of debris and viscous nature of lysed fermentation broth. Often, pretreatment includes introduction of flocculant(s) to the lysed or unlysed broth. Polyelectrolytes have received much attention as a method to enhance cell flocculation in bacterial cell removal from fermentation broth. Baran (1988) *Colloids Surf.* 31:259-264; Bautista et al. (1986) *Biotechnol. Lett.* 8:315-318; Chen and Berg (1993) *Chem. Eng. Sci.* 48:1775-1784; Cumming et al. (1996) *Biotechnol. Tech.* 4:55-60; Hustedt and Theelen (1989) *DeChema Biotechnology Conferences – VCH Verlagsgesellschaft* 3:1071-1075; Ramsden et al. (1998) *Biotechnol. Tech.* 12:599-603; Shan et al. (1996) *J. Biotechnol.* 49:173-178.

[08] Flocculation facilitates the removal of cell debris from the liquid portion containing the enzyme(s) of interest. Some commonly used flocculants include polyethyleneimine, polydiallyldimethyl ammonium chloride, and methacryloyloxyethyl trimethylammonium chloride-acrylamide copolymer. Flocculation of cell debris is a charge-based phenomenon, requiring low ionic strength for effectiveness. As a result, dilution of the fermentation broth by water is generally required to flocculate the cell debris.

[09] Depending on the desired final product concentration and purity, the clarified liquid containing the enzyme(s) of interest from the cell separation step may meet the requirements for formulation to produce the product. However, further processing is often required to increase the concentration of enzyme before formulation. Concentration involves dewatering, which is typically achieved by ultrafiltration or evaporation for heat stable enzymes. Other methods for concentration include precipitation, crystallization, and chromatography. (See, e.g., PCT Application No. WO 91/09941.) These are not common practices for industrial enzyme recovery due to the cost involved.

10 [10] As outlined above, conventional recovery and formulation of enzymes includes multiple steps. Each step added to a manufacturing process decreases the overall process yield and adds cost in the form of energy, time, and labor.

[11] Advances in expression technology have resulted in the ability to obtain relatively high enzyme concentrations (e.g., 10-100 g/l) in fermentation broth. In some cases, the expression level exceeds the solubility limit of an enzyme of interest, and the enzyme is present in a precipitated or crystalline form at the end of fermentation. When a traditional recovery process as described above is used to recover the enzyme from the fermentation broth, enzyme precipitates will be removed simultaneously with insoluble cell debris and other insoluble material during the cell separation step. As a result, the recovery yield will be low. One proposed solution to this problem includes addition of a polyol immediately after a recovery step to a supersaturated enzyme solution to prevent its precipitation. (European Patent No. EP1417301) However, such a process requires additional material costs and adds an extra step to the recovery process. A method for recovering insoluble enzyme without addition of a polyol would be advantageous.

25 [12] Enzyme-containing granules are incorporated into products in several industries, including detergent, textile-processing, food (e.g., baking), animal feed, and fuel ethanol industries. Such granules may be prepared by a number of technologies, including fluidized bed spray coating, high sheer granulation, extrusion, spheronization, prilling, and spray drying.

[13] Traditionally, such enzyme-containing granules contain enzymes that are in soluble form before incorporation into the granules, and if expressed in a microbial host, are at least partially purified to remove microbial cells and/or cell debris produced from lysis of the cells.

30 [14] In cases where insoluble enzyme is present in the microbial broth, solubilization is required before recovery. In some cases this can be achieved easily by changing pH and/or temperature or by addition of simple salts. In other cases, addition of polyols or sugars is

necessary. Subsequent to solubilization, cell separation can be performed. The resulting clarified stream is generally too dilute to be used for formulation. A concentration step, typically by ultrafiltration, is used. The sugar that was added will freely pass the ultrafiltration membrane and become a waste stream. The resulting concentrate generally can be formulated into liquid product. However, it is not always amenable to granulation. As a result, removal of the sugar prior to granulation is necessary. This can be achieved by diafiltration, whereby more waste is generated. The impact of this approach is significant cost increase for both liquid and solid products, by virtue of processing steps and waste disposal. This invention provides an alternate way of way of producing product economically from such broth.

10 [15] There is a need for granular enzyme formulations in which the enzyme is in insoluble form and in which cells and/or insoluble cell components are not removed.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

15 [16] The invention provides methods for recovery and formulation of insoluble enzymes, and compositions comprising insoluble enzymes recovered and formulated as described herein.

[17] In one aspect, a method is provided for recovering an insoluble enzyme from a microbial broth that comprises microbial cells and/or cell debris from microbial cells, comprising recovering insoluble enzyme from the microbial broth without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris., wherein at last some of the enzyme is insoluble in the microbial broth. In one embodiment, a method is provided for recovering an insoluble enzyme from a microbial broth, comprising: (a) providing a microbial broth comprising microbial cells and an enzyme, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth; and (b) recovering insoluble enzyme in the microbial broth without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme, wherein the composition comprises microbial cells and/or cell debris. In some embodiments, the insoluble enzyme is enzymatically active (*i.e.*, the enzyme is catalytically active in the solid state or has catalytic potential and becomes catalytically active when solubilized in an appropriate solvent and under appropriate conditions for catalysis to occur)

25 [18] In some embodiments, the microbial broth is produced by a method selected from: blending an enzyme with a microbial broth that comprises microbial cells and/or cell debris, wherein the enzyme is not produced by the microbial cells and wherein the enzyme is insoluble

in the microbial broth or wherein the enzyme is soluble in the microbial broth and the method further comprises rendering at least some of the enzyme insoluble by addition of a precipitant; adding a precipitant to a microbial broth comprising a soluble enzyme expressed by the microbial cells, thereby causing at least some of the enzyme to become insoluble; and expressing
5 an enzyme in microbial cells in a fermentation medium, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the fermentation medium.

[19] In some embodiments, recovering includes at least one recovery operation selected from broth conditioning; cell lysis; homogenization; diafiltration; and solid-liquid separation. In some embodiments, recovering includes two or more recovery operations selected from broth
10 conditioning; cell lysis; homogenization; diafiltration; and solid liquid separation, performed in any order.

[20] In some embodiments, recovering insoluble enzyme comprises removing at least part of the liquid phase of the microbial broth. In some embodiments, removing at least part of the liquid phase of the microbial broth comprises concentrating the microbial broth solids. In some
15 embodiments, concentrating the microbial broth comprises a membrane filtration process selected from ultrafiltration, microfiltration, reverse osmosis, and nanofiltration. In some embodiments, removing at least part of the liquid phase of the microbial broth, *e.g.*, concentrating the microbial broth, comprises a process selected from rotary drum vacuum filtration, plate and frame filtration, belt filtration, centrifugation, cyclone separation,
20 decantation, and evaporation.

[21] In some embodiments, recovering insoluble enzyme comprises diafiltration.

[22] In some embodiments, the microbial broth is produced by growing a microbial cell that expresses the enzyme in a growth medium under conditions suitable for expression of the enzyme, wherein the enzyme is insoluble under the growth conditions. In other embodiments,
25 the microbial broth is produced by growing a microbial cell that expresses the enzyme in a growth medium under conditions suitable for expression of the enzyme, wherein the enzyme is soluble under the growth conditions, and wherein a precipitant is added prior to recovering the enzyme to render at least some of the enzyme insoluble in the microbial broth. In some embodiments, the precipitant is selected from adjustment of pH, adjustment of temperature,
30 addition of salt, addition of acid, addition of base, addition of at least one other protein, addition of buffer, and addition of polyelectrolyte, or a combination thereof. In one embodiment, insoluble enzyme is produced by adding a precipitant to a microbial broth comprising a soluble enzyme, thereby rendering at least some of the enzyme insoluble in the microbial broth, wherein

the precipitant is selected from adjustment of pH, adjustment of temperature, addition of salt, addition of acid, addition of base, addition of at least one other protein, addition of buffer, and addition of polyelectrolyte, or a combination thereof.

[23] In some embodiments, the composition comprising recovered insoluble enzyme
5 comprises intact microbial cells. In one embodiment, the intact microbial cells are live microbial cells. In another embodiment, the intact microbial cells are dead microbial cells. In other embodiments, the composition comprising recovered insoluble enzyme comprises lysed microbial cells.

[24] In some embodiments in which the expressed enzyme is insoluble in the microbial
10 broth, the method comprises disrupting microbial cell membranes to produce a microbial cell lysate, before or after recovery of insoluble enzyme. In other embodiments in which the expressed enzyme is soluble in the microbial broth, the method comprises disrupting microbial cell membranes before or after addition of a precipitant, prior to recovery of precipitated enzyme.

[25] In some embodiment, the microbial broth comprising microbial cells and/or cell debris
15 comprises a microbial cell lysate, produced by disrupting microbial cell membranes of intact microbial cells.

[26] In some embodiments, disrupting microbial cell membranes comprises contacting the
20 cell with an enzyme that is capable of effecting microbial cell lysis. In one embodiment, the enzyme that is capable of effecting microbial cell lysis is a lysozyme enzyme. In other embodiments, disrupting microbial cell membranes comprises a mechanical cell membrane disruption process, such as homogenization. In some embodiments, disrupting microbial cell membranes comprises a mechanical shear process, for example, selected from homogenization; high shear mixing; pressure extrusion; and high shear pumping. In some embodiments, the
25 method further comprises homogenizing the microbial cell lysate to produce a homogenized microbial cell lysate prior to or after recovering insoluble enzyme.

[27] In some embodiments, the method further comprises diafiltering the microbial cell
30 lysate prior to or after recovering insoluble enzyme. In some embodiments, the method further comprises homogenizing and diafiltering the microbial cell lysate prior or after to recovering insoluble enzyme.

[28] In some embodiments, the microbial cells are bacterial cells. In some embodiments, the bacterial cells are *Bacillus* cells. In some embodiments, the *Bacillus* cells are *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis* cells.

[29] In some embodiments, the microbial cells are fungal cells. In some embodiments, the fungal cells are *Trichoderma* cells. In some embodiments, the *Trichoderma* cells are *Trichoderma reesei* cells.

5 [30] In some embodiments, at least about any of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, or 90% of the enzyme is insoluble in the microbial broth.

[31] In some embodiments of the recovery methods, the purity of the insoluble enzyme is increased by at least about 10%.

[32] In another aspect, the invention provides a composition produced according to a method for recovering an insoluble enzyme from a microbial broth as described herein, wherein
10 the composition comprises recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris. In one embodiment, the composition further comprises at least one formulation ingredient.

[33] In another aspect, the invention provides a method for producing a clarified liquid enzyme solution, comprising: (a) providing a composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, for example, produced according to a method for recovering
15 an insoluble enzyme from a microbial broth, as described herein; (b) solubilizing at least part of the insoluble enzyme by adding one or more substances that dissolve the enzyme and/or by changing the physical conditions such that the enzyme dissolves at least partially, thereby producing a soluble enzyme solution; and (c) removing the solids from the solution prepared in step (b), thereby producing a clarified liquid enzyme solution.

20 [34] In another aspect, the invention provides a method of making an enzyme-containing granule, comprising producing an enzyme-containing granule that comprises a composition comprising insoluble enzyme, *e.g.*, recovered insoluble enzyme, and microbial cells and/or cell debris. In one embodiment, the method comprises: (a) providing a composition comprising insoluble enzyme, *e.g.*, recovered insoluble enzyme, and microbial cells and/or cell debris; and
25 (b) producing an enzyme-containing granule comprising insoluble enzyme. In some embodiments, the composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced according to any of the methods described herein for recovery of an insoluble enzyme from a microbial broth. In one embodiment, the composition comprising enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble
30 enzyme from a microbial broth comprising microbial cells and/or cell debris without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth. In some embodiments, the enzyme is enzymatically active in

the granule (*i.e.*, the enzyme is catalytically active in the solid state or has catalytic potential and becomes catalytically active when solubilized in an appropriate solvent and under appropriate conditions for catalysis to occur).

[35] In one embodiment, the enzyme-containing granule is produced in a top-spray fluid bed processor. In some embodiments, the enzyme-containing granule is produced by a granulation process selected from top-spray fluid bed processing; bottom spray Wurster coater processing; high shear granulation; extrusion; and pan coating.

[36] In one embodiment, the method comprises coating an enzyme-containing layer comprising the composition comprising insoluble enzyme, *e.g.*, recovered insoluble enzyme, and microbial cells and/or cell debris onto a core in said top-spray fluid bed processor. The method optionally includes coating a salt layer between the core and the enzyme-containing layer. In one embodiment, the method further comprises coating a layer comprising a barrier salt over said enzyme-containing layer. In one embodiment, the method further comprises coating an outer coating layer comprising a polymer and/or pigment over said barrier salt layer.

[37] In one embodiment, the method comprises coating a barrier salt layer and/or one or more coating layers over an enzyme-containing core comprising insoluble enzyme, *e.g.*, recovered insoluble enzyme, and microbial cells and/or cell debris. In one embodiment, the enzyme-containing core is produced by top-spray fluid bed processing. In one embodiment, the enzyme-containing core is produced by high shear granulation.

[38] In another aspect, the invention provides an enzyme-containing granule comprising: a core; optionally, a salt layer coated over the core; and an enzyme-containing layer coated over the core, wherein said enzyme-containing layer coated over the core or salt layer, wherein the enzyme-containing layer comprises a composition comprising insoluble enzyme, *e.g.*, recovered insoluble enzyme, and microbial cells and/or cell debris, produced according to any of the methods described herein. In some embodiments, the composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced according to any of the methods described herein for recovery of an insoluble enzyme from a microbial broth. In one embodiment, the composition comprising enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth comprising microbial cells and/or cell debris without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth. In some embodiments, the enzyme is enzymatically active in the granule (*i.e.*, the enzyme is catalytically active in the

solid state or has catalytic potential and becomes catalytically active when solubilized in an appropriate solvent and under appropriate conditions for catalysis to occur).

[39] In one embodiment, the granule further comprises a barrier salt layer coated over said enzyme-containing layer. In one embodiment, the granule further comprises an outer coating layer coated over said barrier salt layer, wherein said outer coating layer comprises a polymer and/or pigment.

[40] In another aspect, the invention provides an enzyme-containing granule comprising an enzyme-containing core and a barrier salt layer and/or one or more coating layers surrounding the core, wherein the core comprises a composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris. In some embodiments, the composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced according to any of the methods described herein for recovery of an insoluble enzyme from a microbial broth. In one embodiment, the composition comprising enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth comprising microbial cells and/or cell debris without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth. In some embodiments, the enzyme is enzymatically active in the granule (*i.e.*, the enzyme is catalytically active in the solid state or has catalytic potential and becomes catalytically active when solubilized in an appropriate solvent and under appropriate conditions for catalysis to occur).

[41] In one embodiment, the enzyme-containing core is produced by top-spray fluid bed processing. In one embodiment, the enzyme-containing core is produced by high shear granulation.

[42] In another aspect, the invention provides compositions comprising any of the enzyme-containing granules described herein. In one embodiment, the composition is a detergent composition. In another embodiment, the composition is a textile processing composition. In another embodiment, the composition is an animal feed composition. In another embodiment, the composition is a food composition.

[43] In another aspect, the invention provides an enzyme-containing liquid formulation comprising a composition comprising an insoluble enzyme, *e.g.*, recovered insoluble enzyme, and microbial cells and/or cell debris. In some embodiments, the composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced according to any of the methods described herein for recovering an insoluble enzyme. In one embodiment, the

composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth. In some embodiments, the enzyme is enzymatically active in the liquid formulation (*i.e.*, the enzyme is catalytically active or has catalytic potential and becomes catalytically active when solubilized in an appropriate solvent and under appropriate conditions for catalysis to occur). In some embodiments, the enzyme-containing liquid formulation further comprises one or more formulation ingredients selected from a polyol; a salt; a preservative; a surfactant; and an antioxidant. In some embodiments, the liquid formulation further comprises a polyol. In some embodiments, the liquid formulation further comprises a salt. In some embodiments, the liquid formulation further comprises a preservative. In some embodiments, the liquid formulation further comprises a surfactant.

[44] In another aspect, the invention provides a method for preparing an enzyme-containing liquid formulation, comprising suspending a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, produced according to any of the methods described herein, in a liquid.

[45] In another aspect, the invention provides a method for preparing an enzyme-containing liquid formulation, comprising: (a) providing a composition comprising recovered insoluble and microbial cells and/or cell debris produced according to any of the methods described herein; (b) and solubilizing the insoluble enzyme in the composition. In one embodiment, the method further comprises removing microbial cells and/or cell debris after step (b) and prior to step (c), thereby producing a clarified liquid formulation.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[46] Figure 1 shows the wash application activity performance of enzyme-containing granules prepared as described in Example 4 after storage in detergent, as described in Example 13.

[47] Figure 2 shows the enzymatic stability of granules prepared in Examples 1, 2, 4, and 6 after storage in detergent.

DETAILED DESCRIPTION

[48] The invention provides methods for recovering and formulating insoluble enzymes from microbial fermentation broth without removing microbial cells or lysed insoluble cell debris from the broth. The invention also provides granular and liquid formulations that contain insoluble enzymes and microbial cells and/or cell debris, for example, recovered according to the methods described herein.

[49] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, and biochemistry, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, for example, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); and Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (Kriegler, 1990).

[50] Unless defined otherwise herein, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second ed., John Wiley and Sons, New York (1994), and Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) provide one of skill with a general dictionary of many of the terms used in this invention. Any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention.

[51] Numeric ranges provided herein are inclusive of the numbers defining the range.

[52] Unless otherwise indicated, nucleic acids are written left to right in 5' to 3' orientation and amino acid sequences are written left to right in amino to carboxy orientation, respectively.

Definitions

[53] As used herein, the term "polynucleotide" refers to a polymeric form of nucleotides of any length and any three-dimensional structure and single- or multi-stranded (*e.g.*, single-stranded, double-stranded, triple-helical, etc.), which contain deoxyribonucleotides, ribonucleotides, and/or analogs or modified forms of deoxyribonucleotides or ribonucleotides, including modified nucleotides or bases or their analogs. Because the genetic code is

degenerate, more than one codon may be used to encode a particular amino acid, and the present invention encompasses polynucleotides which encode a particular amino acid sequence. Any type of modified nucleotide or nucleotide analog may be used, so long as the polynucleotide retains the desired functionality under conditions of use, including modifications that increase
5 nuclease resistance (*e.g.*, deoxy, 2'-O--Me, phosphorothioates, etc.). Labels may also be incorporated for purposes of detection or capture, for example, radioactive or nonradioactive labels or anchors, *e.g.*, biotin. The term polynucleotide also includes peptide nucleic acids (PNA). Polynucleotides may be naturally occurring or non-naturally occurring. The terms "polynucleotide" and "nucleic acid" and "oligonucleotide" are used herein interchangeably.
10 Polynucleotides of the invention may contain RNA, DNA, or both, and/or modified forms and/or analogs thereof. A sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S ("thioate"), P(S)S ("dithioate"), (O)NR₂ ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or
15 CH₂ ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. Polynucleotides may be linear or circular or comprise a combination of linear and circular portions.

[54] As used herein, "polypeptide" refers to any composition comprised of amino acids and
20 recognized as a protein by those of skill in the art. The conventional one-letter or three-letter code for amino acid residues is used herein. The terms "polypeptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to polymers of amino acids of any length. The polymer may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and it may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid polymer that has been modified naturally
25 or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), as well as other modifications known in the art.

30 [55] As used herein, a "vector" refers to a polynucleotide sequence designed to introduce nucleic acids into one or more cell types. Vectors include cloning vectors, expression vectors, shuttle vectors, plasmids, phage particles, cassettes and the like.

[56] As used herein, the term "expression" refers to the process by which a polypeptide is produced based on the nucleic acid sequence of a gene. The process includes both transcription and translation.

[57] As used herein, "expression vector" refers to a DNA construct containing a DNA coding sequence (*e.g.*, gene sequence) that is operably linked to one or more suitable control sequence(s) capable of effecting expression of the coding sequence in a host. Such control sequences include a promoter to effect transcription, an optional operator sequence to control such transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosome binding sites, and sequences which control termination of transcription and translation. The vector may be a plasmid, a phage particle, or simply a potential genomic insert. Once transformed into a suitable host, the vector may replicate and function independently of the host genome, or may, in some instances, integrate into the genome itself. The plasmid is the most commonly used form of expression vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors that serve equivalent functions and which are, or become, known in the art.

[58] A "promoter" refers to a regulatory sequence that is involved in binding RNA polymerase to initiate transcription of a gene. The promoter may be an inducible promoter or a constitutive promoter. A non-limiting example of an inducible promoter which may be used in the invention is *Trichoderma reesei* cbh1, which is an inducible promoter.

[59] The term "operably linked" refers to juxtaposition wherein the elements are in an arrangement allowing them to be functionally related. For example, a promoter is operably linked to a coding sequence if it controls the transcription of the coding sequence.

[60] "Under transcriptional control" is a term well understood in the art that indicates that transcription of a polynucleotide sequence depends on its being operably linked to an element which contributes to the initiation of, or promotes transcription.

[61] "Under translational control" is a term well understood in the art that indicates a regulatory process which occurs after mRNA has been formed.

[62] A "gene" refers to a DNA segment that is involved in producing a polypeptide and includes regions preceding and following the coding regions as well as intervening sequences (introns) between individual coding segments (exons).

[63] As used herein, the term "host cell" refers to a cell or cell line into which a recombinant expression vector for production of a polypeptide may be transfected for expression of the polypeptide. Host cells include progeny of a single host cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in total genomic DNA complement) to the

original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. A host cell includes cells transfected or transformed *in vivo* with an expression vector. "Host cell" refers to both cells and protoplasts created from the cells of a filamentous fungal strain and particularly a *Trichoderma* sp. strain.

5 [64] The term "recombinant" when used in reference to a cell, nucleic acid, protein or vector, indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector, has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein or the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, for example, recombinant cells express genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell or express
10 native genes that are otherwise abnormally expressed, under expressed or not expressed at all.

[65] A "signal sequence" refers to a sequence of amino acids bound to the N-terminal portion of a protein which facilitates the secretion of the mature form of the protein from the cell. The mature form of the extracellular protein lacks the signal sequence which is cleaved off during the secretion process.

15 [66] The term "selective marker" or "selectable marker" refers to a gene capable of expression in a host cell that allows for ease of selection of those hosts containing an introduced nucleic acid or vector. Examples of selectable markers include but are not limited to antimicrobial substances (*e.g.*, hygromycin, bleomycin, or chloramphenicol) and/or genes that confer a metabolic advantage, such as a nutritional advantage, on the host cell.

20 [67] The term "derived from" encompasses the terms "originated from," "obtained from," "obtainable from," "isolated from," and "created from."

[68] The term "filamentous fungi" refers to all filamentous forms of the subdivision Eumycotina (*See*, Alexopoulos, C. J. (1962), *INTRODUCTORY MYCOLOGY*, Wiley, New York). These fungi are characterized by a vegetative mycelium with a cell wall composed of chitin, cellulose, and other complex polysaccharides. The filamentous fungi of the present invention
25 are morphologically, physiologically, and genetically distinct from yeasts. Vegetative growth by filamentous fungi is by hyphal elongation and carbon catabolism is obligatory aerobic. A filamentous fungal parent cell herein may be a cell of a species of, but not limited to, *Trichoderma*, (*e.g.*, *Trichoderma reesei* (previously classified as *T. longibrachiatum* and
30 currently also known as *Hypocrea jecorina*), *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*); *Penicillium sp.*, *Humicola sp.* (*e.g.*, *Humicola insolens* and *Humicola grisea*); *Chrysosporium sp.* (*e.g.*, *C. lucknowense*), *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.* (*e.g.*, *A.*

oryzae, *A. niger*, and *A. awamori*), *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., *Hypocrea* sp., and *Emmericella* sp. (See also, Innis *et al.*, (1985) *Sci.* 228:21 -26).

[69] As used herein, the term “*Trichoderma*” or “*Trichoderma* sp.” refers to any fungal genus previously or currently classified as *Trichoderma*.

5 [70] The term “culturing” refers to growing a population of microbial cells under suitable conditions for growth, in a liquid or solid medium.

[71] The term “heterologous” in reference to a polynucleotide or protein refers to a polynucleotide or protein that does not naturally occur in a host cell. In some embodiments, the protein is a commercially important industrial protein. It is intended that the term encompass
10 proteins that are encoded by naturally occurring genes, mutated genes, and/or synthetic genes. The term “homologous” in reference to a polynucleotide or protein refers to a polynucleotide or protein that occurs naturally in the host cell.

[72] The term “introduced” in the context of inserting a nucleic acid sequence into a cell includes “transfection,” “transformation,” or “transduction” and refers to the incorporation of a
15 nucleic acid sequence into a eukaryotic or prokaryotic cell wherein the nucleic acid sequence may be incorporated into the genome of the cell (*e.g.*, chromosome, plasmid, plastid, or mitochondrial DNA), converted into an autonomous replicon, or transiently expressed.

[73] As used herein, the terms “transformed,” “stably transformed,” and “transgenic” refer to a cell that has a non-native (*e.g.*, heterologous) nucleic acid sequence integrated into its
20 genome or as an episomal plasmid that is maintained through multiple generations.

[74] The terms “isolated,” and “separated” as used herein refer to a material (*e.g.*, a protein, nucleic acid, or cell) that is removed from at least one component with which it is naturally associated. For example, these terms may refer to a material which is substantially or essentially free from components which normally accompany it as found in its native state, such as, for
25 example, an intact biological system.

[75] The term “recovered” as used herein refers to at least partial separation of an enzyme from one or more soluble components of a microbial broth and/or at least partial separation from one or more solvents in the broth, *e.g.*, water or ethanol. A recovered enzyme is often of higher purity than prior to the recovery process. However, in some embodiments, a recovered enzyme
30 may be of the same or lower purity than prior to the recovery process.

[76] The term “secreted protein” refers to a region of a polypeptide that is released from a cell. In some embodiments, the secreted protein is the protein that is released or cleaved from a recombinant fusion polypeptide.

[77] The term "secretion" refers to the selective movement of a protein across a membrane in a host cell to the extracellular space and surrounding media.

[78] As used herein the term "specific activity" means an enzyme unit defined as the number of moles of substrate converted to product by an enzyme preparation per unit time under
5 specific conditions. Specific activity is expressed as units (U)/mg of protein.

[79] As used herein, the terms "detergent composition" and "detergent formulation" are used in reference to mixtures which are intended for use in a wash medium for the cleaning of soiled objects. In some preferred embodiments, the term is used in reference to laundering fabrics and/or garments (*e.g.*, "laundry detergents"). In alternative embodiments, the term refers
10 to other detergents, such as those used to clean dishes, cutlery, etc. (*e.g.*, "dishwashing detergents"). It is not intended that the present invention be limited to any particular detergent formulation or composition. Indeed, it is intended that in addition to enzyme, the term encompasses detergents that contain surfactants, transferase(s), hydrolytic enzymes, oxido reductases, builders, bleaching agents, bleach activators, bluing agents and fluorescent dyes,
15 caking inhibitors, masking agents, enzyme activators, antioxidants, and solubilizers.

[80] As used herein, the term "disinfecting" refers to the removal of contaminants from the surfaces, as well as the inhibition or killing of microbes on the surfaces of items. It is not intended that the present invention be limited to any particular surface, item, or contaminant(s) or microbes to be removed.

20 [81] "Microbial broth" or "fermentation broth" refers to a growth medium in which microbial (*e.g.*, bacterial or fungal) cells are grown and which is suitable for expression of an enzyme as described herein.

[82] An "insoluble enzyme" refers to an enzyme that is present in a solid phase. An insoluble enzyme separates (*i.e.*, partitions) with a solid phase upon separation of solid and
25 liquid phases, for example, solid and liquid phases of a microbial broth. It is understood that in a whole microbial broth some enzyme will typically also be found in the soluble phase in the medium in addition to the insoluble enzyme that is part of the solid phase. The insoluble enzyme may be bound to solids in the microbial broth, such as cell solids or other solid components or may be precipitated or crystallized within the microbial broth.

30 [83] "Solubilization" or "solubilize" as used herein refers to removal of conditions or substances that cause precipitation of an enzyme or keep the enzyme in an insoluble form, or changing of physical conditions (for example, change in temperature; mixing; sonication) or

addition of solubilization substances (for example, solubilization solvents, *e.g.*, water; polyols; salts; acids; bases; surfactants) that render the insoluble enzyme soluble.

[84] "Purifying" or "purification of" an insoluble enzyme refers to refinement of an enzyme of interest by partially or fully removing components that are not of interest, for example, liquid components of a microbial broth that are not of interest. A purified enzyme-containing composition contains a lower amount of one or more components than the mixture from which the enzyme was purified.

[85] Enzyme "purity" in a sample may be calculated by dividing enzyme activity by total amount of dry solids. Dry solids is a measure of all the materials present after liquid has been removed. Dry solids can include, *inter alia*, protein, salt, carbohydrate, metabolites, nuclei acid, lipids, cells, cell debris, and spent fermentation media. Enzyme purity can be expressed as a ratio in relation to one or more of the components of the dry solids.

[86] "Cell debris" refers to cell walls and other insoluble cellular components that are released after disruption of the cell membrane, *i.e.*, after lysis of microbial cells.

[87] Broth conditioning" refers to pretreatment of a microbial fermentation broth designed to improve subsequent broth handling properties. Broth conditioning changes the chemical composition and/or physical and/or rheological properties of the broth to facilitate its use in downstream recovery and/or formulation processes. Broth conditioning may include one or more treatments such as pH modification, heat treatment, cooling, addition of additives (*e.g.*, calcium, salt(s), flocculant(s), reducing agent(s), enzyme activator(s), enzyme inhibitor(s), and/or surfactant(s)), mixing, and/or timed hold (*e.g.*, 0.5 to 200 hours) of the broth without further treatment.

[88] "ATCC" refers to American Type Culture Collection located at Manassas, Va. 20108 (www.atcc.org).

[89] "NRRL" refers to the Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research (and previously known as USDA Northern Regional Research Laboratory), Peoria, Ill.

[90] "A," "an" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise.

Recovery methods

[91] The invention provides a method for recovering an insoluble enzyme from a microbial broth (*i.e.*, a microbial fermentation medium in which cells that express the enzyme have been

grown), without removal of cells or cell debris from the broth. Recovery of the insoluble enzyme includes separating the insoluble enzyme partially or substantially completely from soluble components of the microbial broth, *i.e.*, separating the insoluble enzyme from at least a portion of the soluble components of the microbial broth. The recovery processes described
5 herein convert fermentation broth containing one or more insoluble enzymes of interest into recovered enzyme(s) of interest that may be formulated for use without removal of cells or cell debris.

[92] In one embodiment, the method includes providing a microbial broth in which microbial cells that express the enzyme have been grown and in which at least some of the
10 enzyme is insoluble, and recovering the insoluble enzyme without removing the cells, thereby producing a composition that includes recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris. In another embodiment, the expressed enzyme is soluble in the microbial broth and at least some of the enzyme is rendered insoluble by addition of one or more precipitant(s). In another embodiment, the enzyme is not expressed by the microbial cells but is added to a
15 microbial broth in which microbial cells have been grown. The enzyme added to the microbial broth may be insoluble or may be soluble and rendered insoluble by addition of one or more precipitant(s). Microbial cells may be lysed before or after recovery of the insoluble enzyme, producing insoluble cell debris.

[93] In some embodiments, a microbial broth containing an expressed soluble or insoluble
20 enzyme is combined with a composition containing an externally produced soluble or insoluble enzyme. One or more precipitant(s) is added to render at least one of the enzymes (the enzyme expressed by the microbial cells that produced the microbial broth and/or the enzyme that was added to the microbial broth) insoluble.

[94] In some embodiments, soluble enzyme may be co-recovered with insoluble enzyme
25 when at least part of the liquid phase is removed from the microbial broth.

[95] Generally, the recovered insoluble enzyme is present as an inclusion body.

[96] In some embodiments, two or more microbial broths from separate microbial fermentations are combined, and one or more insoluble enzyme is recovered from the combined microbial broths.

30 [97] In methods of the invention, the insoluble enzyme is enzymatically active, *i.e.*, capable of catalyzing an enzymatic reaction. The insoluble enzyme has catalytic potential, *i.e.*, the enzyme is catalytically active in insoluble form and/or after solubilization in a solvent and under conditions suitable for catalytic activity to occur. In one embodiment, the insoluble

enzyme is catalytically active in both insoluble form and after solubilization. In one embodiment, the insoluble enzyme is inactive in insoluble form and becomes catalytically active after solubilization.

5 [98] In various embodiments, any of at least about 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, or 10% of the enzyme is insoluble in the microbial broth prior to recovery of the insoluble enzyme. In some embodiments, the purity of the insoluble enzyme is increased by at least about 10% after recovery of the insoluble enzyme

[99] Recovery of insoluble enzyme in microbial broth containing microbial cells and/or cell debris may include, for example, concentration and/or diafiltration. The microbial broth
10 containing insoluble enzyme may be concentrated to remove at least part of the soluble portion of the broth, thereby increasing the concentration of the insoluble enzyme in the broth, by one or more techniques that are well known in the art, including but not limited to membrane processes (e.g., ultrafiltration, microfiltration, nanofiltration), centrifugation, and evaporation. Alternatively, or in conjunction with concentration, diafiltration may be employed to replace at
15 least part of the soluble portion of the microbial broth, typically by using a membrane process to diafilter the microbial broth against water.

[100] In methods of the invention, microbial cells are grown in a growth medium under conditions suitable for expression of an enzyme of interest, thereby producing a microbial broth containing the enzyme of interest. For example, the enzyme of interest may be expressed in a
20 host cell from an expression vector. The enzyme of interest may be secreted into the growth medium or may be expressed intracellularly and not secreted.

[101] An enzyme that is secreted into the growth medium may be naturally insoluble in the growth medium under the conditions used for growth of the cells, or insolubility of the enzyme may be induced by adding a precipitant prior to recovery of the enzyme. Examples of
25 precipitants include, but are not limited to salts (e.g., NaCl, NaSO₄, ammonium sulfate, magnesium sulfate, concentration about 0.1 to about 50% (w/v)), polyelectrolytes (e.g., alginate, carboxymethylcellulose, polyacrylic acid, tannic acid, polyphosphates), and alteration in temperature or pH, or a combination thereof. (See, e.g., *Isolation and Purification of Proteins* (2003) R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson, ed., Marcel Dekker, Inc., pp. 225-275; *Bioseparations: Science and Engineering* (2003) R.G. Harrison, P. Todd, S.R. Rudge, D.P. Petrides, pp. 243-
30 271; *Protein Purification: Principles and Practice* (1994) R.K. Scopes, Springer, pp. 71-101.; *Protein Purification Process Engineering* (1994) R.G. Harrison, ed., Marcel Dekker Inc., "Differential Precipitation of Proteins," pp. 115 -208.)

[102] Soluble enzymes may also be rendered insoluble by affinity interactions, *e.g.*, substrate-enzyme interactions or inhibitor-enzyme interactions, for example, by contact with an affinity resin.

[103] An enzyme that is expressed intracellularly and not secreted may be released by lysis of the cells. The released enzyme may be naturally insoluble under conditions in the growth medium into which it is released, or insolubility may be induced by addition of a precipitant prior to recovery of the enzyme as described above.

[104] Microbial cells which may be used to express an enzyme of interest as described herein may be eukaryotic or prokaryotic, for example, a fungal or bacterial microorganism. Examples of eukaryotic microorganisms that may be used include, but are not limited to, *Trichoderma* sp., *Hypocrea* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Hansenula* sp., and *Fusarium* sp. Examples of prokaryotic microorganisms that may be used include, but are not limited to, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Pantoea* sp., *Escherichia* sp., and *Pseudomonas* sp.

[105] Any enzyme that is expressed in an insoluble form or which is expressed in soluble form and can be rendered insoluble, for example by addition of a precipitant, may be recovered in accordance with the methods described herein, and optionally formulated in a granular or liquid formulation as described herein. In some embodiments, the enzyme is a hydrolase, for example, a protease (bacterial (*e.g.*, a subtilisin) or fungal; acid, neutral, or alkaline), an amylase (alpha or beta), a lipase, or a cellulase. In some embodiments, the enzyme is a subtilisin, for example, as described in U.S. Patent No. 4,760,025, EP Patent No. 130 756, or PCT Application No. WO 91/06637. In some embodiments, the enzyme is an alpha-amylase as described in PCT Application No. WO08/112459. In some embodiments, the enzyme is a cellulase, for example, Multifect L250™ or Puradax™, commercially available from Genencor, Division of Danisco US, Inc. In some embodiments, the enzyme is an oxidase, an oxygenase, a transferase, a dehydratase, a reductase, a hemicellulase, a peroxidase, a phospholipase, an esterase, a cutinase, a pectinase, a keratinase, a lipxygenase, a ligninase, a pullulanase, a tannase, a pentosanase, a malanase, a β -glucanase, an arabinosidase, a hyaluronidase, a chondroitinase, a laccase, a catalase, an isomerase, a pectate lyase, or a mannanase, or a combination thereof. In some embodiments, the enzyme is a phytase. In some embodiments, the enzyme is a perhydrolase enzyme, such as, for example, an enzyme as described in PCT Application No. WO 05/056782.

[106] In recovery methods described herein, a composition that includes insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced. In some embodiments, the composition

includes intact microbial cells. In one embodiment, the intact microbial cells are live microbial cells. In one embodiment, the intact microbial cells are dead microbial cells. (See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,801,034, which describes a method for killing cells without lysis by adjusting the pH of a fermentation mixture to a value equal to or less than about two pH units below the pK_a of the compatible organic acid using a mineral acid, and adding a sufficient amount of a compatible organic acid and/or organic acid salt to the mixture to effect a substantially complete cell kill.)

[107] In some embodiments, the composition includes lysed microbial cells, *i.e.*, cell debris produced by lysis of the microbial cells. In one embodiment, the method includes disrupting microbial cell membranes to produce a microbial cell lysate prior to recovery of the insoluble protein. In the case of an enzyme that is soluble in the microbial broth and for which insolubility is induced by addition of one or more precipitant, disruption of the microbial cell membranes may occur either before or after addition of the precipitant(s). In some embodiments, disruption of the cell membranes is achieved by contacting the cells with an enzyme that is capable of microbial cell lysis, for example, a lysozyme enzyme. In one embodiment, cells that have been lysed with an enzyme that is capable of microbial cell lysis are further homogenized to produce a homogenized microbial cell lysate. In other embodiments, disruption of the cell membranes is achieved by mechanical homogenization.

[108] An enzyme-containing composition comprising one or more insoluble enzymes and microbial cells and/or cell debris, prepared as described herein, may be formulated in a granular or liquid formulation.

Granular formulations

[109] Low dusting, stable enzyme granules may be produced from microbial broth containing insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris. In some embodiments, the microbial broth containing insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced in accordance with any of the recovery methods described above. Enzyme granules may be produced by methods that are well known in the art, for example, in a top-spray fluid bed coater, in a bottom spray Wurster coater, or by drum granulation (*e.g.*, high shear granulation) extrusion, or pan coating.

[110] The invention provides a method of making an enzyme-containing granule, comprising providing a composition that contains insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, produced, for example, via a recovery method as described above, and producing an enzyme-

containing granule that includes the composition, wherein the insoluble enzyme in the granule is enzymatically active, *i.e.*, capable of enzymatic activity when contacted by a substrate for the enzyme under conditions that are suitable for catalytic activity to occur. The enzyme is catalytically active in insoluble form and/or when solubilized in a solvent, in the presence of substrate and under conditions suitable for enzymatic catalysis to occur, for example, in an application of use for the enzyme-containing granules. In one embodiment, the enzyme is catalytically active in both insoluble form and after solubilization. In one embodiment, the enzyme is catalytically inactive in insoluble form and becomes catalytically active after solubilization.

[111] In one embodiment, the enzyme-containing granule is produced in a top-spray fluid bed processor. In one embodiment, an enzyme-containing layer that includes the composition containing insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, as described above, is coated onto a core in the top-spray fluid bed processor. Optionally, the granule may contain a salt layer between the core and the enzyme-containing layer. The salt may be selected from, for example, sodium sulfate, sodium citrate, magnesium sulfate, potassium sulfate, and ammonium sulfate, or a mixture thereof. One or more further layers may be coated over the enzyme-containing layer. For example, a barrier salt layer may be coated over the enzyme-containing layer. In some embodiments, one or more outer coating layers may be coated over the enzyme-containing layer, or over a barrier salt layer that is coated over the enzyme-containing layer. Outer coating layer(s) may contain, for example, polymer(s) and/or pigment(s).

[112] In some embodiments, a composition comprising an insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, as described above, is incorporated into a core, and one or more layers are coated over the enzyme-containing core. For example, a barrier salt layer may be coated over the enzyme-containing core. In some embodiments, one or more outer coating layers may be coated over the enzyme-containing core, or over a barrier salt layer that is coated over the enzyme-containing core. Outer coating layer(s) may contain, for example, polymer(s) and/or pigment(s).

[113] In some embodiments, a granule containing an insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by drum granulation, such as high shear granulation. Such a granule contains an enzyme-containing core (containing the insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris) and one or more coating layers over the core. Such coating layers may include, but are not limited to, a polymer, *e.g.*, polyethylene glycol or polyvinyl alcohol, a pigment such as titanium dioxide, or glycerol.

[114] The granules of the invention may also include further components such as, but not limited to plasticizers, fillers, and lubricants.

[115] The invention provides enzyme-containing granules comprising a core and an enzyme-containing composition in a layer surrounding the core or incorporated into the core, and optionally one or more additional layers. The enzyme-containing composition contains an insoluble enzyme and microbial cells and/or microbial cell debris, for example, produced as described above. The insoluble enzyme is enzymatically active in the granule, *i.e.*, capable of enzymatic activity when contacted by a substrate for the enzyme under conditions that are suitable for catalytic activity to occur. Soluble enzyme in a composition containing microbial cells and/or cell debris (*e.g.*, microbial broth with soluble enzyme and cells and/or cell debris) may also be formulated in a granular formulation as described herein.

[116] The granules of the invention exhibit low dust, for example, less than 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 2, 1, or 0.5 mg/pad, as measured by the Heubach attrition test. The granules are stable when stored under ambient humidity and temperature conditions, but soluble or dispersible upon contact with water so as to release the enzyme when in use.

[117] Small granules without protective coatings generate a significant amount of dust during pneumatic transport and filling operations, both in the enzyme granule manufacturing plant and at the customer's manufacturing plant. Dust can be both a hygienic problem and a manufacturing problem, so it must be minimized as much as possible. Several industrial tests have been developed to measure the mechanical resistance to attrition and dusting formation of different granular enzyme formulations. These include the Heubach attrition test and the elutriation test. The Heubach test subjects particles to defined crushing and fluidization forces by using rotating paddles to roll steel balls through a bed of granules contained within a cylindrical chamber and simultaneously percolating a stream of air through the bed to strip off any dust that is generated. The generated dust is drawn by vacuum through a tube and deposited onto a filter pad outside the Heubach chamber. The weight or active component of the dust collected is referred to as Heubach dust. In the elutriation test, granules are placed on a glass frit within a tall glass tube and fluidized with a constant dry airstream over a fixed period of time. A discussion of the principles, operation and limitations of the Heubach and elutriation dust tests can be found for example, in "Enzymes In Detergency" ed. Jan H. van Ee., Ch. 15, pgs. 310 – 312, (Marcel Dekker, Inc. New York (1997) and references cited therein. The Heubach dust test is also described in U.S. Patent Nos. 5,324,649, 5,879,920, and 7,108,821.

Core

[118] The core is the inner nucleus of the granule. Suitable cores for use in the present invention are preferably of a highly hydratable material (i.e., a material which is readily dispersible or soluble in water). The core material should either disperse in water (disintegrate when hydrated) or solubilize in water by going into a true aqueous solution. Clays (bentonite, kaolin), nonpareils and agglomerated potato starch are considered dispersible. Nonpareils are spherical particles consisting of a seed crystal that has been built onto and rounded into a spherical shape by binding layers of powder and solute to the seed crystal in a coating apparatus. Nonpareils are typically made from a combination of a sugar such as sucrose, and a powder such as cornstarch. Suitable cores further include seed crystal materials include sucrose crystals, sodium chloride or sodium sulfate seeds, and other inorganic salts which may be built up with ammonium sulfate, sodium sulfate, potassium sulfate and the like.

[119] Granules composed of inorganic salts and/or sugars and/or small organic molecules may be used as the cores of the present invention. Suitable water soluble ingredients for incorporation into cores include: sodium chloride, ammonium sulfate, sodium sulfate, urea, citric acid, sucrose, lactose and the like. Water-soluble ingredients can be combined with water dispersible ingredients. Cores of the present invention may further comprise one or more of the following: active ingredients, polymers, fillers, plasticizers, fibrous materials, extenders and other compounds known to be used in cores. Suitable polymers include - polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol, polyethylene oxide, and polyvinyl pyrrolidone. The PVA may be partially hydrolyzed (70 - 90%); intermediately hydrolyzed (90 - 98%); fully hydrolyzed (98 - 99%); super hydrolyzed (99 - 100%) PVA, or a mixture thereof, with a low to high degree of viscosity.

[120] The core of an enzyme-containing granule as described herein may consist of one or more inorganic salts or a sucrose crystal. In some embodiments, the core consists of sodium sulfate, sodium citrate, sodium chloride, calcium sulfate, or a combination thereof. In one embodiment, the core consists of sodium sulfate.

[121] Suitable fillers useful in the cores include inert materials used to add bulk and reduce cost, or used for the purpose of adjusting the intended enzyme activity in the finished granule. Examples of such fillers include, but are not limited to, water soluble agents such as urea, salts, sugars and water dispersible agents such as clays, talc, silicates, carboxymethyl cellulose and starches.

[122] Suitable plasticizers useful in the cores of the present invention are nonvolatile solvents added to a polymer to reduce its glass transition temperature, thereby reducing brittleness and enhancing deformability. Typically, plasticizers are low molecular weight organic compounds and are highly specific to the polymer being plasticized. Examples include, but are not limited to, sugars (such as, glucose, fructose and sucrose), sugar alcohols (such as, sorbitol, xylitol and maltitol) polyols (polyhydric alcohols for example, alcohols with many hydroxyl radical groups such as glycerol, ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol), polar low molecular weight organic compounds, such as urea, or other known plasticizers such as dibutyl or dimethyl phthalate, or water.

[123] Suitable fibrous materials useful in the cores of the present invention include materials which have high tensile strength and which can be formed into fine filaments having a diameter of 1 to 50 microns and a length equal to at least four diameters. Typical fibrous materials include, but are not limited to: cellulose, glass fibers, metal fibers, rubber fibers, azlon (manufactured from naturally occurring proteins in corn, peanuts and milk) and synthetic polymer fibers. Synthetics include Rayon[®], Nylon[®], acrylic, polyester, olefin, Saran[®], Spandex[®] and Vinal[®]. Typically cellulose fibers have an average fiber length of 160 microns with a diameter of about 30 microns.

[124] Cores can be fabricated by a variety of granulation techniques well known in the art including: crystallization, precipitation, pan-coating, fluid-bed coating, rotary atomization, extrusion, spheronization, drum granulation and high-shear agglomeration.

[125] In one embodiment of the present invention, the core is a water-soluble or dispersible nonpareil (either sugar or salt as described above) which optionally can be further coated by or built up from the seed crystal (nonpareil) using polyvinylalcohol (PVA) either alone or in combination with anti-agglomeration agents such as titanium dioxide, talc, or plasticizers such as sucrose or polyols. The level of PVA in the coating of the nonpareil may represent from about 0.5% to 20% of the weight of the coated nonpareil.

[126] In general, the core including any active ingredient incorporated therein is an impact-sensitive particle. However, the invention is not limited by the type of core, and numerous patents and publications describe cores that may be used in the invention and reference is made to USP 5,879,920; USP 4,689,287 and WO 00/24877.

Enzymes

[127] One or more insoluble enzymes may be used in the low-dusting, stable enzyme granules of the present invention. An enzyme-containing composition comprising one or more insoluble enzymes and microbial cells and/or cell debris, prepared as described above, is incorporated into the granules described herein.

[128] In some embodiments, the enzyme is a hydrolase, for example, a protease (bacterial (*e.g.*, a subtilisin) or fungal; acid, neutral, or alkaline), an amylase (alpha or beta), a lipase, or a cellulase. In some embodiments, the enzyme is a subtilisin, for example, as described in U.S. Patent No. 4,760,025, EP Patent No. 130 756, or PCT Application No. WO 91/06637. In some embodiments, the enzyme is an alpha-amylase as described in PCT Application No. WO08/112459. In some embodiments, the enzyme is a cellulase, for example, Multifect L250™ or Puradax™, commercially available from Genencor, Division of Danisco US, Inc. In some embodiments, the enzyme is an oxidase, an oxygenase, a transferase, a dehydratase, a reductase, a hemicellulase, a peroxidase, a phospholipase, an esterase, a cutinase, a pectinase, a keratinase, a lipoxygenase, a ligninase, a pullulanase, a tannase, a pentosanase, a malanase, a β -glucanase, an arabinosidase, a hyaluronidase, a chondroitinase, a laccase, a catalase, an isomerase, a pectate lyase, or a mannanase, or a combination thereof. In some embodiments, the enzyme is a phytase. In some embodiments, the enzyme is a perhydrolase enzyme, such as, for example, an enzyme as described in PCT Application No. WO 05/056782. In some embodiments, the enzyme is capable of hydrolyzing a substrate (*e.g.*, a stain).

[129] In one aspect, one or more insoluble enzymes in a composition that contains microbial cells and/or cell debris are incorporated in the core of the granule. In another preferred aspect one or more enzymes in a composition that contains microbial cells and/or cell debris are layered around a core. When layered around the core, the layer comprising the enzyme may additionally include a binder such as a polymer, for example a vinyl polymer such as polyvinyl alcohol (PVA).

[130] A layer comprising the enzyme may further optionally comprise one or more other components in addition to the enzyme-containing composition. Such non-enzyme components include, but are not limited to, polymers (*e.g.*, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol), sugars (*e.g.*, sucrose, saccharose, glucose, fructose, galactose, maltodextrin), starches (*e.g.*, corn starch, wheat starch, tapioca starch, potato starch, chemically or physically modified starch), dextrans, antifoam agents (*e.g.*, polyether polyols such as Foamblast 882 (Emerald Foam Control), Erol DF 204K

(Ouvrie PMC), DG436 (ODG Industries, Inc.), KFO 880 (KABO Chemicals, Inc.)), sugar alcohols (e.g., sorbitol, maltitol, lactitol, xylitol), surfactants (e.g., alcohol ethoxylates such as Neodol 23-6.5 (Shell Chemical LP, Houston, TX) and Lutensol TO65 (BASF)), and anti-redeposition agents (e.g., polyethylene glycol polyesters such as Repel-o-Tex SRP6 (Rhodia, Inc.), Texcare SRN-100 or SRN-170 (Clariant GmbH, Sorez-100(ISP Corp.)).

[131] An "antifoam agent" is a compound that is used to prevent or break foam. These can also be referred to as defoamers, or defoaming agents. These compounds are surface active substances which decrease the surface elasticity of liquids and prevent metastable foam formation. The foam breaks as a result of the tendency to attain the equilibrium between the surface elasticity of the liquid and the surface active substances. (Vardar-Sukan (1991) *Recent Adv. Biotechnol.* 113-146). Antifoams useful in the granules described herein are generally suitable for use in a bioprocess. Suitable antifoam agents include, but are not limited to, fats, oils, waxes, aliphatic acids or esters, alcohols, sulfates, sulfonates, fatty acids, soaps, nitrogenous compounds, phosphates, polyglycols, sulfides, thio compounds, siloxanes and halogenated and inorganic compounds. (Ghildyal (1988) *Adv. Appl. Microbiol.* (1988) 33:173-222). In some embodiments, oils, fatty acids, esters, polyglycols and siloxanes are useful. In some embodiments, the antifoam agent is ethylene oxide propylene oxide copolymer. In one embodiment, the oxide propylene oxide copolymer has an approximate molecule weight of 2200 (e.g., available as Mazu™ from Mazer Chemicals, Inc.).

[132] The granules of the invention may include between 0.01% to 50% or 75% by weight of enzyme solids (recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, produced as described above). In various embodiments, a granule may comprise any of at least about 0.5, 5, 10, 20, 30 or 40% enzyme solids by weight. A layer comprising the enzyme solids, including any binders and other components therein, may comprise between about 0.2% to 70% or 80% by weight of the granule.

[133] In some embodiments, an enzyme-containing layer having a viscosity less than 20 centipoise facilitates agglomeration free granulation.

Coating Layers

[134] The granules of the present invention may further comprise one or more other coating layers. Coating layers may serve any of a number of functions depending on the end use of the granule. For example, coatings may render the active ingredient, particularly enzymes, resistant to oxidation by bleach, or coating layers may bring about the desirable rate of dissolution upon

introduction of the granule into an aqueous medium, or provide a further barrier against ambient moisture in order to enhance the storage stability of the granule and reduce the possibility of microbial growth within the granule.

[135] In an embodiment of the present invention, the coating layer comprises one or more polymer(s) and, optionally, a low residue pigment or other excipients such as lubricants. Such excipients are known to those skilled in the art. Furthermore, coating agents may be used in conjunction with other active agents of the same or different categories.

[136] Suitable polymers include PVA and/or PVP or mixtures of both. If PVA is used, it may be partially hydrolyzed, fully hydrolyzed or intermediately hydrolyzed PVA having low to high degrees of viscosity (preferably partially hydrolyzed PVA having low viscosity). Other vinyl polymers which may be useful include polyvinyl acetate and polyvinyl pyrrolidone. Useful copolymers include, for example, PVA-methylmethacrylate copolymer. Other polymers such as PEG may also be used in the outer layer. These further coating layers may further comprise one or more of the following: plasticizers, pigments, lubricants such as surfactants or antistatic agents and, optionally, additional enzymes. Suitable plasticizers useful in the coating layers of the present invention are those disclosed herein above. Suitable pigments useful in the coating layers of the present invention include, but are not limited to, finely divided whiteners such as titanium dioxide or calcium carbonate, or colored pigments, or a combination thereof. Preferably such pigments are low residue pigments upon dissolution.

[137] As used herein "lubricants" mean any agent which reduces surface friction, lubricates the surface of the granule, decreases static electricity or reduces friability of the granules. Lubricants can also play a related role in improving the coating process, by reducing the tackiness of binders in the coating. Thus, lubricants can serve as anti-agglomeration agents and wetting agents.

[138] Suitable lubricating agents include, but are not limited to, surfactants (ionic, nonionic or anionic), fatty acids, antistatic agents and antidust agents. Preferably the lubricant is a surfactant, and most preferably is an alcohol-based surfactant such as a linear, primary alcohol of a 9 to 15 carbon atom chain length alkane or alkene or an ethoxylate or ethoxysulfate derivative thereof. Such surfactants are commercially available as the Neodol® product line from Shell International Petroleum Company. Other suitable lubricants include, but are not limited to, antistatic agents such as StaticGuard™, Downey™, Triton X100 or 120 and the like, antidust agents such as Teflon™ and the like, or other lubricants known to those skilled in the art.

[139] Other intermediate layers, such as binders, structuring agents, and barrier layers may be included. Suitable barrier materials include, for example, inorganic salts, sugars, or organic acids or salts. Structuring agents can be polysaccharides or polypeptides. Preferred structuring agents include starch, modified starch, carrageenan, cellulose, modified cellulose, gum arabic, guar gum, acacia gum, xanthan gum, locust bean gum, chitosan, gelatin, collagen, casein, polyaspartic acid and polyglutamic acid. Preferably, the structuring agent has low allergenicity. A combination of two or more structuring agents can be used in the granules of the present invention. Binders include but are not limited to sugars and sugar alcohols. Suitable sugars include but are not limited to sucrose, glucose, fructose, raffinose, trehalose, lactose and maltose. Suitable sugar alcohols include sorbitol, mannitol and inositol.

Barrier layer

[140] In some embodiments, a barrier layer is coated over the enzyme layer or over an enzyme-containing core in an enzyme-containing granule as described herein. In some embodiments, the barrier layer contains one or more salts, for example, sodium sulfate, sodium citrate, magnesium sulfate, potassium sulfate, and/or ammonium sulfate. In some embodiments, the barrier layer comprises, consists of, or consists essentially of sodium sulfate. In some embodiments, the barrier layer contains a sugar (e.g., sucrose), a polysaccharide (e.g., starch), or a combination thereof.

[141] In some embodiments, the barrier layer is hydrated. The term "hydrated" means that the barrier material contains water in a free or bound form, or a combination of the two. The water of hydration can be added either during or after the coating process. The degree of hydration will be a function of the material itself and the temperature, humidity and drying conditions under which it is applied.

[142] "Moderate or high" water activity means having a water activity of at least about 0.25, 0.30, or 0.35. The water activity referred to herein is that of the granule itself once it has the barrier material--but no further coatings--coated onto it. Further coatings may mask accurate measurement of the water activity of the barrier material as a distinct layer.

[143] Without wishing to be bound by theory, it is expected that materials with a water activity greater than 0.25 will have a reduced driving force for picking up water under storage conditions in which the relative humidity is greater than 25%. Most climates have relative humidities above 25%. Many detergents have water activities in the range of about 0.3 to 0.4. If the water activity of the granule is actually higher than that of the surrounding detergent or

storage climate, the driving force for pick up of water by the granule should be eliminated, and in fact water may be given up by the granule to its surroundings. Even if the water activity of the granule is lower than that of the detergent or the corresponding relative humidity, the water present in the barrier layer would act as a shield limiting the amount of water being picked up by the granule and affecting the protein core.

[144] In the case of salt hydrates, the hydrated material is a crystalline salt hydrate with bound waters of crystallization. The hydrate should be chosen and applied in a manner such that the resulting coated granule will have a water activity in excess of 0.25, or as high as possible while still retaining granule which is dry to the touch. By applying a salt hydrate, or any other suitable hydrated barrier material, in such a manner, one eliminates any driving force for further uptake of water by the granule. As an important consequence, the driving force for transport of substances which may be detrimental to enzyme activity, such as perborate or peroxide anion, is removed. Without water as a vehicle, these substances are less likely to penetrate the enzyme core. Empirical data demonstrates that enzyme activity in the granule is substantially enhanced by coating the enzyme core with stable salt hydrates.

[145] Examples of suitable salts for production of a hydrated barrier layer include magnesium sulfate heptahydrate, zinc sulfate heptahydrate, copper sulfate pentahydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate, magnesium nitrate hexahydrate, sodium borate decahydrate, sodium citrate dihydrate and magnesium acetate tetrahydrate.

Outer coating layer

[146] In some embodiments, an enzyme containing granule comprises an outer coating layer. In one embodiment, the outer coating layer is coated over the enzyme layer. In some embodiments, an outer coating layer is coated over one or more intermediate coating layers. In one embodiment, the outer coating layer is coated over a barrier layer, which is coated over the enzyme layer or over an enzyme-containing core.

[147] In some embodiments, the outer coating layer includes one or more polymers. Suitable polymers include, but are not limited to, polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone (PVP), polyvinyl acetate, PVA-methylmethacrylate copolymer, PVP-PVA copolymer, cellulose derivatives such as methylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxycellulose, ethylcellulose, carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, polyethylene glycol, polyethylene oxide, chitosan, gum arabic, xanthan, carrageenan, latex polymers, and enteric polymer.

[148] In some embodiments, the outer coating layer includes PVA. Suitable PVAs for incorporation in the outer coating layer include partially hydrolyzed, fully hydrolyzed, and intermediately hydrolyzed PVAs having low to high degrees of viscosity. (See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,324,649.) In one embodiment, the outer coating layer includes partially hydrolyzed PVA having low viscosity.

[149] In some embodiments, the outer coating layer includes one or more pigments. Nonlimiting examples of suitable pigments include finely divided whiteners, such as titanium dioxide or calcium carbonate, calcium sulfate, talc, or colored pigments or dyes. Typically, such pigments are low residue pigments upon dissolution. In addition to polymers and/or pigments, the outer coating layer may also include one or more of plasticizers, extenders, lubricants, surfactants, and anti-redeposition agents.

[150] Suitable plasticizers include, but are not limited to, polyols (*e.g.*, sugars, sugar alcohols, polyethylene glycols (PEGs), glycol, propylene glycol), urea, triethyl citrate, dibutyl or dimethyl phthalate, or water.

[151] Suitable extenders include, but are not limited to, sugars (*e.g.*, sucrose or starch hydrolysates, such as maltodextrin or corn syrup solids), clays (*e.g.*, kaolin or bentonite), and talc. An "extender" is a substance (generally lower cost) added to another substance (generally higher cost and higher performance) to modify or dilute it.

[152] Suitable lubricants include, but are not limited to, nonionic surfactants (*e.g.*, Neodol, Lutensol TO 65), tallow alcohols, fatty acids, fatty acid salts (*e.g.*, magnesium stearate), and fatty acid esters.

[153] Suitable surfactants include, but are not limited to, alcohol ethoxylates such as Neodol 23-6.5 and Lutensol TO65.

[154] Suitable anti-redeposition agents include, but are not limited to, polyethylene glycol polyesters such as Repel-o-Tex SRP6, Texcare SRN-100 or SRN-170, and Sorex-100.

Other Adjunct Ingredients

[155] Adjunct ingredients may be added to the granules of the present invention, including but not limited to: metallic salts, solubilizers, activators, antioxidants, dyes, inhibitors, binders, fragrances, enzyme protecting agents/scavengers such as ammonium sulfate, ammonium citrate, urea, guanidine hydrochloride, guanidine carbonate, guanidine sulfonate, thiourea dioxide, monethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, amino acids such as glycine, sodium glutamate and the like, proteins such as bovine serum albumin, casein and the like, etc.,

surfactants, including anionic surfactants, ampholytic surfactants, nonionic surfactants, cationic surfactants and long-chain fatty acid salts, builders, alkalis or inorganic electrolytes, bleaching agents, bluing agents and fluorescent dyes, and caking inhibitors. Surfactants are described, for example, in PCT Application PCT/US92/00384, which is incorporated herein by reference.

5

Matrix Granules

[156] In one embodiment, the granule includes a protein "matrix" which includes the composition containing the insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris mixed together with a combination of a sugar or sugar alcohol and a structuring agent. (See, *e.g.*,
10 EP1037968B1.) Optionally, a barrier layer can be layered over the enzyme-containing matrix or a barrier material can be included in the enzyme-containing matrix. Also, optionally, a coating can be applied over a seed particle, an enzyme matrix surrounding the seed particle, and/or the barrier layer. In some embodiments, the structuring agent is a polysaccharide or a polypeptide. The matrix can be homogenous throughout the core or can be layered over a seed particle. There
15 can be one or more layers between the seed particle and the matrix or the matrix and the barrier layer, for example, a coating such as polyvinyl alcohol (PVA). A matrix granule can be produced, for example, in a top-spray fluid bed processor.

[157] Seed particles are inert particles upon which the enzyme matrix can be layered can be composed of inorganic salts, sugars, sugar alcohols, small organic molecules such as organic
20 acids or salts, minerals such as clays or silicates or a combination of two or more of these. Suitable soluble ingredients for incorporation into seed particles include: sodium chloride, potassium chloride, ammonium sulfate, sodium sulfate, sodium sesquicarbonate, urea, citric acid, citrate, sorbitol, mannitol, oleate, sucrose, lactose and the like. Soluble ingredients can be combined with dispersible ingredients such as talc, kaolin or bentonite. Seed particles can be
25 fabricated by a variety of granulation techniques including: crystallization, precipitation, pan-coating, fluid-bed coating, fluid-bed agglomeration, rotary atomization, extrusion, prilling, spheronization, drum granulation and high shear agglomeration. In the granules of the present invention, if a seed particle is used then the ratio of seed particles to granules is 1:1.

[158] Suitable sugars include sugars such as sucrose, glucose, fructose, raffinose, trehalose,
30 lactose and maltose. Suitable sugar alcohols include sorbitol, mannitol and inositol. The ratio of sugar or sugar alcohol to structuring agent in the matrix is preferably 0.1-90% by weight of the protein matrix. The sugar or sugar alcohol in the matrix can be sugar or sugar alcohol added to the protein or can be from the fermentation broth in which the protein is present.

[159] The structuring agent can be a polysaccharide or a polypeptide. These classes of compounds have the simultaneous desirable properties of high molecular weight and high water solubility. Without wishing to be bound by theory, it is believed that the high molecular weight of the structuring agent contributes two important properties which a sugar or sugar alcohol matrix alone would lack: (1) providing cohesion and strength to the particle, greatly reducing the tendency of the particle to dust; and (2) serving as a diffusion barrier to water and small molecules by virtue of forming a polymer network or "cage" throughout the matrix structure. This greatly improves the stability of the granule.

[160] Preferred structuring agents include starch, modified starch, carrageenan, cellulose, modified cellulose, gum arabic, guar gum, acacia gum, xanthan gum, locust bean gum, chitosan, gelatin, collagen, casein, polyaspartic acid and polyglutamic acid. Preferably, the structuring agent has low allergenicity. A combination of two or more structuring agents can be used in the granules of the present invention.

[161] The enzyme-containing matrix may further contain one or more synthetic polymers or other excipients as known to those skilled in the art. Suitable synthetic polymers include polyethylene oxide, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, polyethylene glycol and polyethylene oxide/polypropylene oxide. The matrix may also further contain plasticizers and anti-agglomeration agents. Suitable plasticizers useful in the present invention include polyols such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol (PEG), urea, or other known plasticizers such as triethyl citrate, dibutyl or dimethyl phthalate or water. Suitable anti-agglomeration agents include fine insoluble or sparingly soluble materials such as talc, TiO_2 , clays, amorphous silica, magnesium stearate, stearic acid and calcium carbonate.

[162] The matrix granules can further contain a barrier layer. A barrier layer is used to slow or prevent the diffusion of substances that can adversely affect the protein or enzyme into the matrix. The barrier layer is made up of a barrier material and can be coated over the protein core or the barrier material can be included in the protein core. Suitable barrier materials include, for example, inorganic salts or organic acids or salts. The matrix without the protein can also be used as a barrier layer.

[163] The matrix granules of can also contain one or more coating layers. For example, such coating layers may be one or more intermediate coating layers or such coating layers may be one or more outside coating layers or a combination thereof. Coating layers may serve any of a number of functions in a granule composition, depending on the end use of the enzyme granule. For example, coatings may render the enzyme resistant to oxidation by bleach, bring about the

desirable rates of dissolution upon introduction of the granule into an aqueous medium, or provide a barrier against ambient moisture in order to enhance the storage stability of the enzyme and reduce the possibility of microbial growth within the granule.

[164] Suitable coatings include water soluble or water dispersible film-forming polymers such as polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone (PVP), cellulose derivatives such as methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose, hydroxycellulose, ethylcellulose, carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, polyethylene glycol, polyethylene oxide, gum arabic, xanthan, carrageenan, chitosan, latex polymers, and enteric coatings. Furthermore, coating agents may be used in conjunction with other active agents of the same or different categories.

[165] Suitable PVAs for incorporation in the coating layer(s) of the granule include partially hydrolyzed, fully hydrolyzed and intermediately hydrolyzed PVAs having low to high degrees of viscosity. Preferably, the outer coating layer comprises partially hydrolyzed PVA having low viscosity. Other vinyl polymers which may be useful include polyvinyl acetate and polyvinyl pyrrolidone. Useful copolymers include, for example, PVA-methylmethacrylate copolymer and PVP-PVA copolymer. The coating layers of may further contain one or more of the following: plasticizers, extenders, lubricants, pigments, and optionally additional enzymes. Suitable plasticizers useful in the coating layers of the present invention are plasticizers including, for example, polyols such as sugars, sugar alcohols, or polyethylene glycols (PEGs), urea, glycol, propylene glycol or other known plasticizers such as triethyl citrate, dibutyl or dimethyl phthalate or water. Suitable pigments useful in the coating layers of the present invention include, but are not limited to, finely divided whiteners such as titanium dioxide or calcium carbonate or colored pigments and dyes or a combination thereof. Preferably such pigments are low residue pigments upon dissolution. Suitable extenders include sugars such as sucrose or starch hydrolysates such as maltodextrin and corn syrup solids, clays such as kaolin and bentonite and talc. Suitable lubricants include nonionic surfactants such as Neodol, tallow alcohols, fatty acids, fatty acid salts such as magnesium stearate and fatty acid esters.

Liquid formulations

[166] The invention provides enzyme-containing liquid formulations that comprise an insoluble enzyme in a composition with microbial cells and/or cell debris, for example, recovered as described above. The enzyme is enzymatically active or has catalytic potential, *i.e.*, is capable of catalytic activity in an assay or application of use in an appropriate solvent and

conditions for catalytic activity to occur, in the liquid formulation. In various embodiments, the liquid formulation may comprise formulation ingredients (stabilizing substances) that "stabilize," *i.e.*, maintain the physical and biochemical properties of the product during storage, including but not limited to the following: one or more polyols, one or more salts, one or more preservative substances, or one or more buffer salts (and acid or base for pH adjustment), one or more surfactants, one or more amino acids, one or more antioxidants or a combination thereof. In some embodiments, the liquid formulation comprises one or more polyols, for example, glucose, sucrose, sorbitol, glycerol, lactose, dextrose, propylene glycol, concentration about 1 to about 50% (w/v). In some embodiments, the liquid formulation comprises one or more salts, for example, NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄, sodium formate, sodium citrate, monosodium glutamate, calcium chloride, concentration about 0.1 to about 50% (w/v). In some embodiments, the liquid formulation comprises one or more preservative agents, for example, sodium benzoate, sodium propionate, potassium sorbate, paraben, concentration about 0.1 to about 5% (w/v). In some embodiments, the liquid formulation comprises one or more buffer salts, for example, sodium acetate, sodium citrate, MES, HEPES, concentration 0.1 to about 20% (w/v). An acid (*e.g.*, a weak acid, such as acetic acid or formic acid, or a strong acid, such as HCl or H₂SO₄) or a base (*e.g.*, NaOH or KOH) may be used for pH adjustment. For a reference describing liquid formulations generally, see *Isolation and Purification of Proteins* (2003) R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson, ed., Marcell Dekker, Inc., pp. 549-604.

[167] The invention also provides methods for preparing liquid formulations that comprise an insoluble enzyme, for example, recovered as described above, in a composition with microbial cells and/or cell debris, wherein the enzyme is enzymatically active in the liquid formulation. In one embodiment, the method comprises providing a composition comprising an insoluble enzyme, for example, recovered as described above, and microbial cells and/or cell debris, partially or fully solubilizing the insoluble enzyme, for example, by combining the composition with one or more formulation ingredients as described above, *e.g.*, one or more polyol, one or more salt, one or more preservative substance, and/or one or more buffer salt, optionally in a liquid, typically water, thereby producing a liquid formulation. In one embodiment, the method comprises providing a composition comprising an insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, for example, recovered as described above, solubilizing the insoluble enzyme, for example, combining the composition with one or more formulation ingredients as described above, *e.g.*, one or more polyol, one or more salt, one or more preservative substance, and/or one or more buffer salt, with the composition comprising

recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, optionally in a liquid, typically water, and clarifying the composition containing soluble enzyme by removing microbial cells and/or cell debris, for example, by filtration, such as membrane filtration, and/or centrifugation, thereby producing a clarified liquid formulation.

5

Compositions

[168] The invention provides compositions containing enzyme-containing granules or liquid formulations as described above. In addition to the enzyme-containing granules or liquid formulations, the compositions contain components suitable for use of the granules or liquid formulations in particular applications of use, such as cleaning (*e.g.*, detergents), textile processing, animal feed, brewing, baking, food, or beverage applications..

Cleaning compositions

[169] In some embodiments, enzyme-containing granules or liquid formulations as described herein are incorporated into a cleaning composition, such as a detergent, *e.g.*, for laundry or dishwashing use, to provide cleaning performance and/or cleaning benefits. Enzymes suitable for inclusion in a cleaning composition include, but are not limited to, hemicellulases, peroxidases, proteases, cellulases, xylanases, lipases, phospholipases, esterases, cutinases, pectinases, keratinases, reductases, oxidases, phenoloxidases, lipxygenases, ligninases, pullulanases, tannases, pentosanases, malanases, β -glucanases, arabinosidases, hyaluronidase, chondroitinase, laccases, perhydrolases, and amylases, or mixtures thereof. A typical combination is a cocktail of conventional applicable enzymes like protease, lipase, cutinase and/or cellulase in conjunction with amylase.

[170] Adjunct materials may also be included in the cleaning composition, for example, to assist or enhance cleaning performance, for treatment of the substrate to be cleaned, or to modify the aesthetics of the cleaning composition as is the case with perfumes, colorants, dyes or the like. It is understood that such adjuncts are in addition to the enzyme-containing granules as described herein. The precise nature of these additional components, and levels of incorporation thereof, will depend on the physical form of the composition and the nature of the cleaning operation for which it is to be used. Suitable adjunct materials include, but are not limited to, surfactants, builders, chelating agents, dye transfer inhibiting agents, deposition aids, dispersants, enzyme stabilizers, catalytic materials, bleach activators, bleach boosters, preformed peracids, polymeric dispersing agents, clay soil removal/anti-redeposition agents, brighteners,

suds suppressors, dyes, perfumes, structure elasticizing agents, fabric softeners, carriers, hydrotropes, processing aids and/or pigments. In addition to the disclosure below, suitable examples of such other adjuncts and levels of use are described in U.S. Patent Nos. 5,576,282, 6,306,812, and 6,326,348.

5 [171] In some embodiments, the cleaning composition does not contain phosphate. In some embodiments, the cleaning composition is a non-phosphate-containing dishwashing detergent. In some embodiments, the cleaning composition is a non-phosphate-containing laundry detergent. In some embodiments, the non-phosphate cleaning composition contains a non-phosphate builder, *e.g.*, citrate.

10 [172] Surfactants - A cleaning composition as described herein may comprise a surfactant or surfactant system wherein the surfactant can be selected from nonionic surfactants, anionic surfactants, cationic surfactants, ampholytic surfactants, zwitterionic surfactants, semi-polar nonionic surfactants, and mixtures thereof. A surfactant is typically present at a level of about 0.1% to about 60%, about 1% to about 50% or about 5% to about 40% by weight of the subject
15 cleaning composition.

[173] Builders - A cleaning composition as described herein may comprise one or more detergent builder or builder system. When a builder is used, the subject cleaning composition will typically comprise at least about 1%, about 3% to about 60%, or about 5% to about 40% builder by weight of the subject cleaning composition.

20 [174] Builders include, but are not limited to, the alkali metal, ammonium and alkanolammonium salts of polyphosphates, alkali metal silicates, alkaline earth and alkali metal carbonates, aluminosilicate builders, polycarboxylate compounds, ether hydroxypolycarboxylates, copolymers of maleic anhydride with ethylene or vinyl methyl ether, 1, 3, 5-trihydroxy benzene-2, 4, 6-trisulphonic acid, and carboxymethyloxysuccinic acid, the
25 various alkali metal, ammonium and substituted ammonium salts of polyacetic acids such as ethylenediamine tetraacetic acid and nitrilotriacetic acid, as well as polycarboxylates such as mellitic acid, succinic acid, citric acid, oxydisuccinic acid, polymaleic acid, benzene 1,3,5-tricarboxylic acid, carboxymethyloxysuccinic acid, and soluble salts thereof.

[175] Chelating Agents - A cleaning composition as described herein may contain one or
30 more chelating agent. Suitable chelating agents include, but are not limited to, copper, iron and/or manganese chelating agents and mixtures thereof. When a chelating agent is used, the cleaning composition may comprise about 0.1% to about 15%, or about 3.0% to about 10% chelating agent by weight of the subject cleaning composition.

[176] Deposition Aid – A cleaning composition as described herein may contain a one or more deposition aid. Suitable deposition aids include, but are not limited to, polyethylene glycol, polypropylene glycol, polycarboxylate, soil release polymers such as polytelephthalic acid, and clays such as Kaolinite, montmorillonite, atapulgite, illite, bentonite, halloysite, and mixtures thereof.

[177] Dye Transfer Inhibiting Agents – A cleaning composition as described herein may include one or more dye transfer inhibiting agent. Suitable polymeric dye transfer inhibiting agents include, but are not limited to, polyvinylpyrrolidone polymers, polyamine N-oxide polymers, copolymers of N-vinylpyrrolidone and N-vinylimidazole, polyvinylloxazolidones, and polyvinylimidazoles, and mixtures thereof. When present in a subject cleaning composition, dye transfer inhibiting agent may be present at levels of about 0.0001% to about 10%, about 0.01% to about 5%, or about 0.1% to about 3% by weight of the cleaning composition.

[178] Dispersants – A cleaning composition as described herein may contain one or more dispersant. Suitable water-soluble organic dispersants include, but are not limited to, the homo- or co-polymeric acids or their salts, in which the polycarboxylic acid comprises at least two carboxyl radicals separated from each other by not more than two carbon atoms.

[179] Enzyme Stabilizers - Enzymes for use in detergents can be stabilized by various techniques. Enzymes employed herein can be stabilized, for example, by the presence of water-soluble sources of calcium and/or magnesium ions in the finished compositions that provide such ions to the enzymes.

[180] Catalytic Metal Complexes - A cleaning composition as described herein may include one or more catalytic metal complex. One type of metal-containing bleach catalyst is a catalyst system comprising a transition metal cation of defined bleach catalytic activity, such as copper, iron, titanium, ruthenium, tungsten, molybdenum, or manganese cations, an auxiliary metal cation having little or no bleach catalytic activity, such as zinc or aluminum cations, and a sequester having defined stability constants for the catalytic and auxiliary metal cations, particularly ethylenediaminetetraacetic acid, ethylenediaminetetra (methylenephosphonic acid) and water-soluble salts thereof. Such catalysts are disclosed in U.S. Patent No. 4,430,243. Manganese-containing catalysts useful herein are known, and are described, for example, in U.S. Patent No. 5,576,282. Cobalt bleach catalysts useful herein are known, and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,597,936 and 5,595,967. Such cobalt catalysts are readily prepared by known procedures, such as taught for example in U.S. Patent Nos. 5,597,936 and U.S. 5,595,967.

[181] Compositions herein may also include a transition metal complex of a macropolycyclic rigid ligand - abbreviated as "MRL". As a practical matter, and not by way of limitation, the compositions and cleaning processes herein can be adjusted to provide on the order of at least one part per hundred million of the active MRL species in the aqueous washing medium, and will often provide about 0.005 ppm to about 25 ppm, about 0.05 ppm to about 10 ppm, or about 0.1 ppm to about 5 ppm, of the MRL in the wash liquor. Suitable transition-metals in a transition-metal bleach catalyst include manganese, iron and chromium. In one embodiment, an MRL is an ultra-rigid ligand that is cross-bridged, such as 5,12-diethyl-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2] hexadecane. Suitable transition metal MRLs are readily prepared by known procedures, such as taught for example in PCT Application No. WO 00/332601 and U.S. Patent No. 6,225,464.

[182] The cleaning compositions disclosed herein can be used to clean a situs on a surface or fabric. Typically at least a portion of the situs is contacted with a cleaning composition as described above, in neat form or diluted in a wash liquor, and then the situs is optionally washed and/or rinsed. Washing includes, but is not limited to, scrubbing, and mechanical agitation. A fabric may comprise most any fabric capable of being laundered in normal consumer use conditions. The disclosed cleaning compositions are typically employed at concentrations of from about 500 ppm to about 15,000 ppm in solution. When the wash solvent is water, the water temperature typically ranges from about 5 °C to about 90 °C and, when the situs comprises a fabric, the water to fabric mass ratio is typically from about 1:1 to about 30:1.

Textile processing compositions

[183] In some embodiments, enzyme-containing granules or liquid formulations as described herein are incorporated into a textile processing composition. Enzymes suitable for inclusion in a textile processing composition include, but are not limited to, cellulases, perhydrolases, polyesterases, amylases, catalases, pectinases, and laccases. In some embodiments, a textile processing composition may also include an anti-redeposition agent (e.g., Repel-O-Tex, Sorez 100 (ISP Corp.)).

Animal feed compositions

[184] In some embodiments, enzyme-containing granules or liquid formulations as described herein are incorporated into an animal feed composition. Enzymes suitable for inclusion in a feed composition include cellulolytic and/or hemicellulolytic enzymes. Nonlimiting examples of

enzymes suitable for incorporation into a feed composition include phytases, xylanases, phosphatases, proteases, amylases, esterases, redox enzymes, lipases, transferases, cellulases, phospholipases, ligninases, and β -glucanases.

5 [185] The following examples are intended to illustrate, but not limit, the invention.

EXAMPLES

10

Example 1

Preparation of Enzyme Concentrate and Granular Formulation from Fermentation Broth Containing Partially Precipitated Enzyme using Conventional Recovery Process

15 *Preparation of Bacterial Lysate*

[186] *Bacillus licheniformis* that recombinantly expresses α -amylase enzyme as described in PCT Application No. WO08/112459 was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth contained precipitated enzyme. A sample of the broth was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The resulting supernatant contained 10% of the total
20 enzyme activity measured in the whole broth before centrifugation. 90% of the enzyme was insoluble. Alpha-amylase activity was determined as described in U.S. Patent Application No. 12/041,917.

[187] For cell lysis, the broth temperature was adjusted to 40°C and 0.01% (w/w) lysozyme was added. The broth was held for 48 hrs, and then diluted with 0.6 parts water and immediately
25 flocculated with 4% (w/w) cationic polymer (C581, from Cytec Industries, Inc.). Diatomaceous earth (FW12, from World Minerals) was added at 4% (w/w) to the flocculated broth and filtered through a dead end vacuum filter fitted with HR9000 filter pad coated with FW12 diatomaceous cake. The enzyme yield in the filtrate after cell separation was 6%.

[188] The clarified filtrate was concentrated with an ultrafilter fitted with a 10K molecular
30 weight cutoff (MWCO) polyethersulfone (PES) spiral wound membrane (KOCH Membrane Systems). The final concentrate contained 11.5 g/l or 1.15% (w/v) active α -amylase and 27.04% (w/w) dry solid matter.

[189] The overall yield for this process was 5% of the starting enzyme activity in whole broth and the purity was 4.3% (active dry solids/total dry solids).

Granular Formulation

5 [190] A granular composition was prepared from the enzyme concentrate as follows.

[191] **Spray 1:** 513 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 μm to 350 μm , was loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 2062 grams of solution containing 11.5 g/L of active amylase, 1.6% talc (Nytal 400), 0.5% polyvinyl alcohol (Erkol 5/88), 1.0% anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance
10 Materials), and 1.6% corn starch (Cargill Foods) was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	3.6 gpm (grams per minute), increasing to 13.6 gpm over 1.5 hours. Kept at 13.6 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	69°C, increased to 72°C after 30 minutes
15 Outlet Temperature	Between 43.9°C and 46.2°C
Fluidization Air Flow	Between 76.0 cfm (cubic feet per minute) and 81.4 cfm
Atomization Air Pressure	30 psi (pounds per square inch), increasing to 40 psi over 1.5 hours.

1043 grams of product was harvested.

20 [192] **Spray 2:** 1043 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1667 grams of an aqueous solution containing 333 grams of sodium sulfate (20 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

25 Solution Spray Rate	8.3 gpm (grams per minute), increasing to 19.2 gpm over 15 minutes. Kept at 19.2 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	63°C, increased to 80°C after 15 minutes
Outlet Temperature	Between 44.2°C and 47.8°C
Fluidization Air Flow	Between 79.5 cfm (cubic feet per minute) and 82.6 cfm
30 Atomization Air Pressure	40 psi

1363 grams of product was harvested.

[193] **Spray 3:** 1363 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1065 grams of an aqueous solution containing 83 grams (5%

of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), 83 grams (5% of granule composition) of titanium dioxide (R902 from DuPont), and 25 grams (1.5% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

- 5 Solution Spray Rate 4.2 gpm (grams per minute), increasing to 12.2 gpm over 30
 minutes. Kept at 12.2 gpm for remainder of experiment.
- Inlet Temperature 75°C, increased to 78°C after 30 minutes
- Outlet Temperature Between 46.0°C and 52.4°C
- Fluidization Air Flow Between 78.4 cfm (cubic feet per minute) and 81.2 cfm
- 10 Atomization Air Pressure 40 psi

1487 grams of final product was harvested.

[194] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 1.66 mg/pad.

15

Example 2

Preparation of Enzyme Concentrate and Granular Formulation from Fermentation Broth Containing Partially Precipitated Enzyme by Dissolving the Precipitate Followed by Conventional Recovery Process

20

Preparation of Enzyme Concentrate

[195] *Bacillus licheniformis* that recombinantly expresses α -amylase enzyme as described in PCT Application No. WO08/112459 was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth contained precipitated enzyme. A sample of the broth was

25 centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The resulting supernatant contained 5% of the total enzyme activity measured in the whole broth before centrifugation. 95% of the enzyme was insoluble.

30

[196] For cell lysis, the broth temperature was adjusted to 40°C and 0.01% (w/w) lysozyme was added. The broth was held for 1.5 hrs. The temperature was then increased to 60°C and held at 60°C for 1 hr. The broth was then diluted with 1 part water.

[197] The precipitated enzyme remained insoluble after the heat step and the dilution. The lysate was then incubated with gentle mixing at room temperature for 28 hours with 5% (w/w)

glucose and 3% (w/w) NaCl at pH 9 before cell separation. Most of the precipitated α -amylase activity (84%) was solubilized.

[198] The lysate was then flocculated with 4% (w/w) cationic polymer (C581, from Cytec Industries, Inc.). Diatomaceous earth (FW12, from World Minerals) was added at 4% (w/w) to the flocculated broth and filtered through a rotary vacuum drum filter pre-coated with FW12 diatomaceous cake. The enzyme yield in the filtrate after cell separation was 87%.

[199] The clarified filtrate was concentrated with an ultrafilter fitted with a 10K MWCO PES spiral wound membrane (KOCH Membrane Systems). The final concentrate contained 60 g/l or 6% (w/v) active α -amylase and 27% (w/w) dry solid matter.

[200] The overall yield for this process was 84% of the starting enzyme activity in whole broth and the purity was 22% (active dry solids/total dry solids). However, the concentrate contained glucose and NaCl. Removal of these substances would adversely impact the cost of the process.

Granular Formulation

[201] A granular composition was prepared from the enzyme concentrate as follows.

[202] **Spray 1:** 478 grams of sucrose crystal, with a particle diameter size range of 200 μ m to 600 μ m, was loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 628 grams of solution containing 60.0 g/L of active amylase, 115 grams (9.8% of granule composition) of corn starch (Cargill Foods) was spray-coated onto the sucrose crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	2.9 gpm (grams per minute), increasing to 17.3 gpm over 52 minutes. Kept at 20.2 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	Between 71 °C and 74 °C for spray 1
Outlet Temperature	Between 44.7°C and 48.5°C
Fluidization Air Flow	Between 83.5 cfm (cubic feet per minute) and 87.2 cfm
Atomization Air Pressure	32 psi (pounds per square inch), increasing to 40 psi over 52 minutes.

700 grams of product was harvested.

[203] **Spray 2:** 700 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1308 grams of an aqueous solution containing 120 grams (10.2% of granule composition) of sucrose (C&H Sugars), 120 grams (10.2% of granule composition) of corn starch (Cargill Foods), 72 grams (6.1% of granule composition) of titanium

dioxide (R902 DuPont), and 15 grams (1.3% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then spray coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	12.2 gpm (grams per minute), increasing to 20.2 gpm over 10 minutes. Kept at 20.2 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	74°C, increased to 82°C after 15 minutes
Outlet Temperature	Between 46.3°C and 47.7°C
Fluidization Air Flow	Between 85.0 cfm (cubic feet per minute) and 88.0 cfm
Atomization Air Pressure	Between 35 psi and 36 psi

988 grams of product was harvested.

[204] **Spray 3:** 988 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 586 grams of an aqueous solution containing 29 grams (2.5% of granule composition) of Hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC E-15 Dow Chemicals), and 4 grams (0.3% of granule composition) of polyethylene glycol 600 (Carbowax by Electron Microscopy Sciences) were then sprayed coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	8.1 gpm (grams per minute), increasing to 15.6 gpm over 45 minutes. Kept at 15.6 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	Between 75 °C and 82 °C
Outlet Temperature	Between 43.6°C and 50.3°C
Fluidization Air Flow	Between 85.0 cfm (cubic feet per minute) and 87.8 cfm
Atomization Air Pressure	40 psi

1014 grams of final product was harvested.

[205] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 2.80 mg/pad.

Example 3**Preparation of Enzyme Concentrate and Granular Formulation from Homogenized Cell Lysate from Fermentation Broth Containing Partially Precipitated Enzyme**

5

Preparation of Homogenized Cell Lysate

[206] *Bacillus licheniformis* that recombinantly expresses α -amylase enzyme as described in PCT Application No. WO08/112459 was fermented using well-known techniques in the art.

10 After fermentation, the broth contained precipitated enzyme. A sample of the broth was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The resulting supernatant contained 6% of the total enzyme activity measured in the whole broth before centrifugation.

[207] Cell lysis was performed as described in Example 2. The lysate was then chilled to 10°C and homogenized at 6,000 psi in a Gaulin Homogenizer. The enzyme yield was 90%, and
15 the purity was 6% (active dry solids/total dry solids).

Granular Formulation

[208] A granular composition was prepared from the homogenized lysate as follows.

[209] **Spray 1:** 17.64 kilograms of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter
20 size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Deseret 60 fluid bed coater and fluidized. To this, 259.41 kilograms of solution containing 12.53 g/L of active amylase, 5.88 kilograms (5% of granule composition) talc (Nytal 400), 1.18 kilograms (1.0% of granule composition) anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance Materials), 7.06 kilograms (6% of granule composition) corn starch (Cargill Foods), and 1.18 kilograms (1.0% of granule composition)
25 Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	50 gpm (grams per minute), increasing to 500 gpm over 3 hours. Kept at 500 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	Between 73°C and 85°C
30 Outlet Temperature	Between 42.7°C and 55.7°C
Fluidization Air Flow	Between 800 cfm (cubic feet per minute) and 952 cfm
Atomization Air Pressure	60 psi (pounds per square inch), increasing to 68 psi over 5 hours.

65.2 kilograms of product was harvested.

Solution Spray Rate Between 500 gpm (grams per minute) to 580 gpm over entire spray 2.

Outlet Temperature Between 48.3°C and 54.1°C

Fluidization Air Flow Between 1109 cfm (cubic feet per minute) and 1234 cfm

88 kilograms of product was harvested.

Solution Spray Rate	Between 310 gpm (grams per minute) to 400 gpm over entire spray 3..
---------------------	---

Outlet Temperature Between 48.8°C and 56.8°C

Fluidization Air Flow Between 1070 cfm (cubic feet per minute) and 1238 cfm

Atomization Air Pressure	Between 70 psi and 76 psi
--------------------------	---------------------------

[212] **Spray 4:** 97.6 kilograms of the enzyme granules from spray 3 were loaded into a

Deseret 60 fluid bed coater and fluidized, 9.41 kilograms of an aqueous solution containing 471 grams (0.4% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

Inlet Temperature 85°C

Outlet Temperature Between 47.1°C and 51.1°C

Fluidization Air Flow Between 1126 cfm (cubic feet per minute) and 1220 cfm

Atomization Air Pressure Between 65 psi and 68 psi

101.2 kilograms of product was harvested.

[213] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of
5 the granules was 0.33 mg/pad.

Example 4

Preparation of Enzyme Concentrate and Granular Formulation from Homogenized and

Diafiltered Cell Lysate from Fermentation Broth Containing Partially Precipitated

10

Enzyme

Preparation of Homogenized Cell Lysate

[214] *Bacillus licheniformis* that recombinantly expresses α -amylase enzyme as described in
15 PCT Application No. WO08/112459 was fermented using well-known techniques in the art.
After fermentation, the broth contained precipitated enzyme. A homogenized lysate was
prepared as described in Example 3.

[215] The homogenized lysate was diafiltered and concentrated with an ultrafilter fitted with
a 10K MWCO PES spiral wound membrane (KOCH Membrane Systems). The final
20 concentrate contained 11 g/l or 1.1% (w/v) active α -amylase and 16.7% (w/w) dry solid matter.

[216] The homogenized lysate was diafiltered using city water. Constant volume
diafiltration was performed, *i.e.*, by holding the volume in the feed tank containing the
homogenized lysate constant, adding city water to replace the volume of permeate removed from
the system. The total amount of diafiltration water used was 0.5x of the initial homogenized
25 lysate. The diafiltered homogenized lysate was further concentrated to 16% (w/w) dry solids.
The purity of the resulting preparation was 9.3% (active dry solids/total dry solids). The purity
was 1.25 times higher than the homogenized lysate prepared in Example 3.

Granular Formulation

30 [217] A granular composition was prepared from the homogenized and diafiltered lysate as
follows.

[218] Spray 1: 29.606 kilograms of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter
size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Deseret 60 fluid bed coater and fluidized.

To this, 170.79 kilograms of solution containing 14.2 g/L of active amylase, 5.88 kilograms (5% of granule composition) talc (Nytal 400), 1.18 kilograms (1.0% of granule composition) anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance Materials), 11.77 kilograms (10% of granule composition) corn starch (Cargill Foods), and 1.18 kilograms (1.0% of granule composition) Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate 106 gpm (grams per minute), increasing to 550 gpm over 5 hours.
Kept at 550 gpm for remainder of experiment.

Inlet Temperature Between 80°C and 82.6°C

10 Outlet Temperature Between 51.0°C and 60.9°C

Fluidization Air Flow Between 804 cfm (cubic feet per minute) and 1058 cfm

Atomization Air Pressure 65 psi (pounds per square inch), increasing to 70 psi over 5 hours.

66.6 kilograms of product was harvested.

[219] **Spray 2:** 66.6 kilograms of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Deseret 60 fluid bed coater and fluidized. 111.11 kilograms of an aqueous solution containing 22.22 kilograms of sodium sulfate (20 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate Between 400 gpm (grams per minute) to 640 gpm over entire spray 2.

20 Inlet Temperature Between 83.5°C and 85.6 °C

Outlet Temperature Between 51.4°C and 54.8°C

Fluidization Air Flow Between 1097 cfm (cubic feet per minute) and 1246 cfm

Atomization Air Pressure 70 psi

93.8 kilograms of product was harvested.

25 [220] **Spray 3:** 93.8 kilograms of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Deseret 60 fluid bed coater and fluidized. 84.97 kilograms of an aqueous solution containing 6.12 kilograms (5.2% of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), 6.12 kilograms (5.2% of granule composition) of titanium dioxide (R902 from DuPont), 1.53 kilograms (1.3% of granule composition) of talc (Nytal 400) and 1.53 kilograms (1.3% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

30 Solution Spray Rate Between 200 gpm (grams per minute) to 410 gpm over entire spray 3.

Inlet Temperature Between 79.6°C and 83.9 °C
Outlet Temperature Between 55.9°C and 59.6°C
Fluidization Air Flow Between 1121 cfm (cubic feet per minute) and 1244 cfm
Atomization Air Pressure Between 70 psi and 75 psi

5 108.4 kilograms of product was harvested.

[221] **Spray 4:** 108.4 kilograms of the enzyme granules from spray 3 were loaded into a Deseret 60 fluid bed coater and fluidized. 9.41 kilograms of an aqueous solution containing 471 grams (0.4% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

10 Solution Spray Rate 250 gpm over entire spray 4
Inlet Temperature Between 82.7°C and 82.9 °C
Outlet Temperature Between 57.4°C and 59.7°C
Fluidization Air Flow Between 1157 cfm (cubic feet per minute) and 1299 cfm
Atomization Air Pressure 70 psi

15 110.0 kilograms of product was harvested.

[222] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 0.15 mg/pad.

20 Example 5

Preparation of Enzyme Concentrate and Granular Formulation from Diafiltered Cell Lysate from Fermentation Broth Containing Partially Precipitated Enzyme

Preparation of Diafiltered Cell Lysate

25 [223] *Bacillus licheniformis* that recombinantly expresses α -amylase enzyme as described in PCT Application No. WO08/112459 was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth contained precipitated enzyme. The cells were lysed as described in Example 2. The lysate was diafiltered using city water as described in Example 4. The diafiltered lysate was further concentrated to 18.2% (w/w) dry solids. The purity of the
30 resulting preparation was 17% (active dry solids/total dry solids). The purity was 1.7 times higher than the homogenized lysate prepared in Example 3.

Example 6**Preparation of Enzyme Concentrate and Granular Formulation from Diafiltered Cell Lysate from Fermentation Broth Containing Partially Precipitated Enzyme*****Preparation of Diafiltered Cell Lysate***

[224] *Bacillus licheniformis* that expresses α -amylase enzyme as described in PCT Application No. WO08/112459 was fermented as described in Example 1. The lysate was diafiltered and concentrated as in Example 5. The resulting preparation had an enzyme activity of 2.14% and the dry solids were 17.2%.

Granular Formulation

[225] A granular composition was prepared from the diafiltered lysate as follows.

[226] **Spray 1:** 691 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 1470 grams of solution containing 23.41 g/L of active amylase, 5% talc (Nytal 400), 1.0% anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance Materials), and 5% corn starch (Cargill Foods) was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	2.6 gpm (grams per minute), increasing to 14.1 gpm over 1.5 hours.
Inlet Temperature	69°C, increased to 72°C after 30 minutes
Outlet Temperature	Between 44.9°C and 45.8°C
Fluidization Air Flow	Between 78.6 cfm (cubic feet per minute) and 80.8 cfm
Atomization Air Pressure	30 psi (pounds per square inch), increasing to 40 psi over 1.5 hours.

1050 grams of product was harvested.

[227] **Spray 2:** 1050 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1667 grams of an aqueous solution containing 333 grams of sodium sulfate (20 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	Between 15.6 gpm (grams per minute) and 17.4 gpm
Inlet Temperature	Between 78°C and 82°C
Outlet Temperature	Between 46.0°C and 47.5°C

Fluidization Air Flow Between 78.6 cfm (cubic feet per minute) and 82.0 cfm

Atomization Air Pressure 40 psi

1352 grams of product was harvested.

[228] **Spray 3:** 1352 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector
5 FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1127 grams of an aqueous solution containing 88 grams (5%
of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), 88 grams (5% of granule
composition) of titanium dioxide (R902 from DuPont), and 26 grams (1.5% of granule
composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the
enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

10 Solution Spray Rate 3.2 gpm (grams per minute), increasing to 10.2 gpm over 60
minutes. Kept at 10.2 gpm for remainder of experiment.

Inlet Temperature 75°C, increased to 80°C after 10 minutes

Outlet Temperature Between 52.0°C and 53.7°C

Fluidization Air Flow Between 82.5 cfm (cubic feet per minute) and 83.1 cfm

15 Atomization Air Pressure 40 psi

1535 grams of final product was harvested.

[229] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of
the granules was 1.50 mg/pad.

20 Example 7

Preparation of Bacterial Broth Concentrate with Soluble Enzyme and Granular Formulation

Preparation of Enzyme Concentrate

25 [230] *Bacillus subtilis* that expresses subtilisin protease was fermented using well-known
techniques in the art. After fermentation, the broth contained mostly soluble subtilisin enzyme.
The broth was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The resulting supernatant contained activity
that was the same as the activity in a whole broth sample. The broth was adjusted to pH 5.8±0.2,
diluted with 1.5±0.2 parts of city water and immediately flocculated with 8% C311 (Kemira).
30 The flocculated broth was filtered through a rotary vacuum drum filter precoated with
diatomaceous earth (FW12, from World Minerals). The clarified filtrate was concentrated with an
ultrafilter fitted with a 10K MWCO PES spiral wound membrane (KOCH Membrane Systems).
The final concentrate contained 57.23 g/L and 19.1% (w/w) dry solid matter. The subtilisin

activity in the enzyme concentrate remained soluble before granulation, as determined by the supernatant (14,000 rpm, 4 min) activity of the enzyme concentrate, which was the same the same activity as the whole enzyme concentrate.

5 **Granular Formulation**

[231] A granular composition was prepared from the ultrafiltration concentrate as follows.

[232] **Spray 1:** 643 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Vector FI-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 593 grams of solution containing an active protease, 0.7% talc (Nytal 400), 0.9% anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance Materials), and 0.5% of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	3.5 gpm (grams per minute), increasing to 9.0 gpm over 1.5 hours.
Inlet Temperature	57°C, increased to 86°C after 1 hour 15 minutes
15 Outlet Temperature	Between 45.2°C and 48.9°C
Fluidization Air Flow	Between 72.4 cfm (cubic feet per minute) and 83.6 cfm
Atomization Air Pressure	30 psi (pounds per square inch), increasing to 37 psi over 30 minutes.

769 grams of product was harvested.

20 [233] **Spray 2:** 769 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 2001 grams of an aqueous solution containing 400 grams of sodium sulfate (27.7 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	Between 10 gpm (grams per minute) and 17.5 gpm
25 Inlet Temperature	Between 73°C and 76°C
Outlet Temperature	Between 44.6°C and 45.7°C
Fluidization Air Flow	Between 79.7 cfm (cubic feet per minute) and 81.4 cfm
Atomization Air Pressure	40 psi

1178 grams of product was harvested.

30 [234] **Spray 3:** 1178 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1127 grams of an aqueous solution containing 78 grams (5.4% of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), 78 grams (5.4% of granule composition) of titanium dioxide (R902 from DuPont), 20 grams (1.35% of granule

composition) of talc (Nytal 400) and 20 grams (1.35% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate 5.2 gpm (grams per minute), increasing to 12.2 gpm over 30 minutes. Kept at 12.2 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature 70°C, increased to 76°C after 15 minutes
Outlet Temperature Between 51.0°C and 52.5°C
Fluidization Air Flow Between 80.7 cfm (cubic feet per minute) and 84.2 cfm
Atomization Air Pressure Between 40 psi and 42 psi

1356 grams of product was harvested.

[235] **Spray 4:** 1356 grams of the enzyme granules from spray 3 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 67.0 grams of an aqueous solution containing 3 grams (0.22% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate 17.0 gpm over entire spray 4
Inlet Temperature 76°C
Outlet Temperature Between 44.0°C and 46.5°C
Fluidization Air Flow Between 80.8 cfm (cubic feet per minute) and 81.7cfm

1359 grams of final product was harvested.

[236] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 1.03 mg/pad.

Example 8

Preparation of Enzyme Concentrate with Precipitates and Granular Formulation

Preparation of Enzyme Concentrate with Precipitated Enzyme

[237] Sodium sulfate was added at a concentration 12% (w/v) to the final enzyme concentrate after ultrafiltration in Example 7 to induce precipitation. The concentrate with sodium sulfate was mixed at 10 °C for 18 hours. The resulting slurry was used for granulation.

Granular Formulation

[238] A granular composition was prepared from the enzyme concentrate containing precipitated enzyme as follows.

5 [239] **Spray 1:** 500 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Vector FI-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 999 grams of solution containing an active protease, 0.7% talc (Nytal 400), 0.9% anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance Materials), and 0.5% of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters
10 were as follows:

Solution Spray Rate	4.5 gpm (grams per minute), increasing to 10.6 gpm over 30 minutes
Inlet Temperature	Between 69.0°C and 74.0°C
Outlet Temperature	Between 44.5°C and 47.1°C
15 Fluidization Air Flow	Between 79.8 cfm (cubic feet per minute) and 82.2 cfm
Atomization Air Pressure	31 psi (pounds per square inch), increasing to 40 psi over 60 minutes.

705 grams of product was harvested.

[240] **Spray 2:** 705 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector
20 FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1847 grams of an aqueous solution containing 369 grams of sodium sulfate (27.7 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	Between 15.2 gpm (grams per minute) and 18.2 gpm
25 Inlet Temperature	Between 70°C and 78°C
Outlet Temperature	Between 42.9°C and 45.1°C
Fluidization Air Flow	Between 80.2 cfm (cubic feet per minute) and 81.2 cfm
Atomization Air Pressure	40 psi

1061 grams of product was harvested.

30 [241] **Spray 3:** 1061 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1000 grams of an aqueous solution containing 72 grams (5.4% of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), 72 grams (5.4% of granule composition) of titanium dioxide (R902 from DuPont), 18 grams (1.35% of granule

composition) of talc (Nytal 400) and 18 grams (1.35% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	3.8 gpm (grams per minute), increasing to 9.9 gpm over 60 minutes. Kept at 9.9 gpm for remainder of experiment.
Inlet Temperature	72°C, increased to 84°C after 15 minutes
Outlet Temperature	Between 51.4°C and 52.9°C
Fluidization Air Flow	Between 80.4 cfm (cubic feet per minute) and 82.3 cfm
Atomization Air Pressure	Between 40 psi and 42 psi

1226 grams of product was harvested.

[242] **Spray 4:** 1226 grams of the enzyme granules from spray 3 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 62.0 grams of an aqueous solution containing 3 grams (0.22% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate	17.0 gpm over entire spray 4
Inlet Temperature	69°C
Outlet Temperature	Between 41.4°C and 42.3°C
Fluidization Air Flow	Between 80.8 cfm (cubic feet per minute) and 80.5cfm

1228 grams of final product was harvested.

[243] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 2.50 mg/pad.

Example 9

Preparation of Lysed Bacterial Broth with Enzyme Precipitates and Granular Formulation

Preparation of Bacterial Broth Lysate with Precipitated Enzyme

[244] *Bacillus subtilis* that expresses subtilisin protease as described in Example 7 was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth contained mostly soluble subtilisin enzyme. Lysozyme was added to the broth at a concentration of 1%

was added to the broth and held at 37°C for 3 hr. The resulting lysate, containing both soluble and insoluble enzyme, contained 57 g/mL activity and 18.23% dry solids.

Granular Formulation

5 [245] A granular composition was prepared from the lysate with precipitate enzyme as follows.

[246] **Spray 1:** 585 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 µm to 350 µm, was loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 993 grams of solution containing an active protease, 0.7% talc (Nytal 400), 0.9% anti-foam (Foamblast 882 from Emerald Performance Materials), and 0.5% of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

15	Solution Spray Rate	4.5 gpm (grams per minute), increasing to 12.5 gpm over 2 hours
	Inlet Temperature	Between 63°C and 70°C
	Outlet Temperature	Between 43.0°C and 47.5°C
	Fluidization Air Flow	Between 79.8 cfm (cubic feet per minute) and 81.1 cfm
	Atomization Air Pressure	31 psi (pounds per square inch), increasing to 38 psi over 30 minutes.

785 grams of product was harvested.

[247] **Spray 2:** 785 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 2001 grams of an aqueous solution containing 400 grams of sodium sulfate (27.7 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

25	Solution Spray Rate	Between 15.2 gpm (grams per minute) and 21.2 gpm
	Inlet Temperature	Between 65°C and 78°C
	Outlet Temperature	Between 44.1°C and 45.6°C
	Fluidization Air Flow	Between 78.5 cfm (cubic feet per minute) and 81.6 cfm
	Atomization Air Pressure	Between 39 psi and 40 psi

1168 grams of product was harvested.

[248] **Spray 3:** 1168 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 1083 grams of an aqueous solution containing 78 grams (5.4% of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), 78 grams (5.4% of granule composition) of titanium dioxide (R902 from DuPont), 20 grams (1.35% of granule composition) of talc (Nytal 400) and 20 grams (1.35% of granule composition) of Neodol (23-

6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate 3.0 gpm (grams per minute), increasing to 8.0 gpm over 60 minutes. Kept at 8.0 gpm for remainder of experiment.

5 Inlet Temperature 73°C, increased to 78°C after 30 minutes

Outlet Temperature Between 52.0°C and 52.9°C

Fluidization Air Flow Between 80.3 cfm (cubic feet per minute) and 83.7 cfm

Atomization Air Pressure Between 40 psi and 42 psi

1347 grams of product was harvested.

10 [249] **Spray 4:** 1347 grams of the enzyme granules from spray 3 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 67.0 grams of an aqueous solution containing 3 grams (0.22% of granule composition) of Neodol (23-6.5 from Shell Chemicals) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate 12.6 gpm over entire spray 4

15 Inlet Temperature 63°C

Outlet Temperature Between 41.1°C and 44.1°C

Fluidization Air Flow Between 80.9 cfm (cubic feet per minute) and 81.5cfm

1349 grams of final product was harvested.

[250] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of

20 the granules was 1.4 mg/pad.

Example 10

25 Preparation of Fungal Broth Concentrate with Soluble Enzyme and Granular Formulation

Preparation of Concentrated Fungal Fermentation Broth with Soluble Enzyme

[251] *Trichoderma reesei* that expresses glucoamylase was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth contained mostly soluble gluco-amylase enzyme. Glucoamylase activity was measured as described in U.S. Patent No. 7,262,041. The

30 cells were removed by microfiltration as described in U.S. Patent Application No. 2007/0246406. The clarified broth was concentrated 10x using a 10K MWCO PES Spiral wound membrane. The enzyme concentrate was stored at 10°C until ready for use. Upon

storage, precipitates formed. The precipitates were removed by centrifugation (10,000 g, 20min, 10°C). The resulting clear supernatant was used for preparation of a granular composition as described below.

5 **Granular Formulation**

[252] A granular composition was prepared from the soluble enzyme in fungal fermentation broth as follows.

[253] **Spray 1:** 466 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Vector FI-1 fluid bed coater and fluidized. To
10 this, 512 grams of solution containing an active amylase, 5% corn starch (Cargill Foods) and 1% of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

Solution Spray Rate 8.2 gpm (grams per minute), increasing to 10.1 gpm over 15 minutes. 10.1 gpm was held for the remainder of the experiment.

15 Inlet Temperature Between 71°C and 77°C

Outlet Temperature Between 46.7°C and 49.1°C

Fluidization Air Flow Between 75.3 cfm (cubic feet per minute) and 80.7 cfm

Atomization Air Pressure 31 psi (pounds per square inch), increasing to 41 psi over 45 minutes.

20 615 grams of product was harvested.

[254] **Spray 2:** 615 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 2667 grams of an aqueous solution containing 533 grams of sodium sulfate (40 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules.

The spray coating parameters were as follows:

25 Solution Spray Rate Between 15.4 gpm (grams per minute) and 18.5 gpm

Inlet Temperature Between 72°C and 78°C

Outlet Temperature Between 43.8°C and 45.7°C

Fluidization Air Flow Between 80.0 cfm (cubic feet per minute) and 81.8 cfm

Atomization Air Pressure 38 psi

30 1113 grams of product was harvested.

[255] **Spray 3:** 1113 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 667 grams of an aqueous solution containing 40 grams (3% of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol) and 80 grams (6% of granule

composition) of talc (Nytal 400) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

- Solution Spray Rate 4.6 gpm (grams per minute), increasing to 11.0 gpm over 60 minutes.
- Inlet Temperature 68°C, increased to 82°C after 10 minutes
- Outlet Temperature Between 44.2°C and 52.4°C
- Fluidization Air Flow Between 82.3 cfm (cubic feet per minute) and 83.5 cfm
- Atomization Air Pressure 40 psi

1221 grams of final product was harvested.

[256] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 1.66 mg/pad.

Example 11

Preparation of Fungal Broth with Enzyme Precipitates and Granular Formulation

[257] *Trichoderma reesei* that expresses gluco-amylase as described in Example 10 was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth contained mostly soluble gluco-amylase enzyme. Cells were killed without lysis as described in U.S. Patent No. 5,801,034. The precipitate obtained from centrifuging the enzyme concentrate from Example 10 was added to the broth with killed cells. The resulting broth contained both soluble and insoluble enzyme. The enzyme-containing broth exhibited 447 U/mL activity and 19.7% (w/w) dry solids . The amount of precipitate present was determined by measuring the activity of the whole sample, and the supernatant (14,000 rpm, 5 min). The data is summarized in Table 1 below. 90% of the activity was present in the supernatant (as soluble enzyme) and 10% was present in precipitated form.

TABLE 1

	Weight (g)	Activity (GAU/ml)	Total Activity (x10 ³ GAU)
Broth + Ppt	200	447.2	89.440
Supernatant	181	445.9	80.708

Granular Formulation

[258] A granular composition was prepared from the fungal broth containing precipitate enzyme as follows.

5 [259] **Spray 1:** 472 grams of sodium sulfate crystal (Saltec), with a particle diameter size range of 150 μ m to 350 μ m, was loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. To this, 494 grams of solution containing an active amylase, 5% corn starch (Cargill Foods) and 1% of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol), was spray-coated onto the sodium sulfate crystals. The spray coating parameters were as follows:

10	Solution Spray Rate	8.2 gpm (grams per minute), increasing to 10.8 gpm over 10 minutes. 10.8 gpm was held for the remainder of the experiment.
	Inlet Temperature	Between 68°C and 71°C
	Outlet Temperature	Between 44.7°C and 46.5°C
	Fluidization Air Flow	Between 78.5 cfm (cubic feet per minute) and 79.4 cfm
15	Atomization Air Pressure	33 psi (pounds per square inch), increasing to 40 psi over 20 minutes.

612 grams of product was harvested.

[260] **Spray 2:** 612 grams of the enzyme granules from spray 1 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 2667 grams of an aqueous solution containing 533 grams of sodium sulfate (40 % of granule composition) were then spray coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

	Solution Spray Rate	Between 17.2 gpm (grams per minute) and 23.4 gpm
	Inlet Temperature	Between 74°C and 82°C
	Outlet Temperature	Between 44.6°C and 45.5°C
25	Fluidization Air Flow	Between 81.2 cfm (cubic feet per minute) and 81.9 cfm
	Atomization Air Pressure	38 psi

1081 grams of product was harvested.

[261] **Spray 3:** 1081 grams of the enzyme granules from spray 2 were loaded into a Vector FL-1 fluid bed coater and fluidized. 667 grams of an aqueous solution containing 40 grams (3% of granule composition) of poly vinyl alcohol (5/88 from Erkol) and 80 grams (6% of granule composition) of talc (Nytal 400) were then sprayed coated onto the enzyme granules. The spray coating parameters were as follows:

	Solution Spray Rate	7.2 gpm (grams per minute), increasing to 10.8 gpm over 60 minutes.
--	---------------------	---

Inlet Temperature 78°C, increased to 81°C over 60 minutes
Outlet Temperature Between 52.7°C and 53.1°C
Fluidization Air Flow Between 83.2 cfm (cubic feet per minute) and 83.6 cfm
Atomization Air Pressure 41 psi

5 1190 grams of final product was harvested.

[262] Using the Heubach attrition test, the granules were analyzed for dust. The dust level of the granules was 7.9 mg/pad.

10

Example 12

Enzymatic Stability in Detergent for Granules Prepared from Concentrate containing Cell Components and Insoluble Enzyme

15

[263] The stability of enzyme granules prepared as described in Example 4 was assessed in various detergent bases: Calgonite 5-1, WFK with Citrate, WFK with Phosphate, and Somat (Henkel). WFK detergent bases are available from wfk Testgewebe GmbH (www.testgewebe.de). The enzyme granules in detergent (2% w/w) were kept at 22°C in closed containers. Residual enzyme activity was measured after storage at time 0, 5 weeks, 2 months and 4 months. The data is summarized in Table 2 below.

20

Table 2
Enzyme Granule Stability in Detergent

Detergent Base	Day 0	5 weeks	2 months	4 months
Calgonite 5-1	100%	98%	93%	96%
WFK with Citrate	100%	100%	94%	96%
WFK with Phosphate	100%	100%	96%	100%
Somat	100%	89%	89%	98%

25

Example 13
Application Performance of Granules Prepared from Concentrate containing Cell
Components and Insoluble Enzyme

[264] The washing performance of enzyme granules prepared as described in Example 4 was assessed before and after storage in IEC A* containing bleach detergent base. The samples were stored in open cups for 1 week at 37°C/70% relative humidity (RH). Application tests with fresh granules and fresh detergent and with granules stored in detergent for 1 week were performed using various stains: CS-26 (corn starch on cotton), CS-27 (potato starch on cotton), CS-28 (rice starch on cotton), CS-29 (tapioca starch on cotton), and EMPA-161 (starch on cotton).

Wash test

[265] The wash test was performed in a Miele Novotronic W822 washing machine: program “Normal”/“Cotton”, temperature 40°C, water hardness 8.5 GH. Detergent: IEC A* with bleach: dosage 8 g/L (=136 g/wash), including 0.15 g Purafect 4000 E (available from Genencor Division of Danisco US Inc.) and 0.139 g of Example 4 granules.

Performance measurements

[266] Measurements were made with a Minolta CR300 Colorimeter: CIELAB L*ab Scale, D65 Standard Illuminate, without UV filter, white background. Soil removal (SR) was calculated using the following formula:

$$\frac{\Delta E_{\text{after wash- before wash}}}{\Delta E_{\text{unsoiled fabric swatch-before wash}}} \times 100 = \%SR$$

Where:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

[267] Figure 1 shows that the test performance of Example 4 granules remained unchanged upon storage.

Example 14

Enzymatic Stability During Storage for Granules Prepared from Concentrate containing Cell Components and Insoluble Enzyme

[268] Enzyme granules prepared as described in examples 7-9 were evaluated for storage stability. The conditions used were 37°C in 70% Relative Humidity chamber with samples placed in open containers. Residual activity was measured and calculated based on initial activity. The data is summarized in Table 3 below.

TABLE 3

Sample	Time (days)				
	0	3	5	7	14
Example #7 (Granule from Soluble Enzyme)	100%	96%	97%	100%	91%
Example #8 (Granule form Precipitated Enzyme)	100%	108%	109%	108%	109%
Example #9 (Granule from Precipitated Enzyme Lysate)	100%	96%	95%	99%	96%

Example 15

Comparison of Properties of Recovery Procedures Described in Examples 1-5

[269] The activity and purity of α -amylase recovered as described in the examples 1-5 above is presented in Table 4. Enzyme purity was calculated by dividing the enzyme activity by the total amount of dry solids.

Table 4
Enzyme Lysate Concentrate Properties

Example	Enzyme Purity By Dry Solids	Yield (%)	Relative Waste	Purification Relative to Initial Lysate	Yield relative to Example 1	Purification Relative to Example 1
1	4.3	5%	0	0.6	1.0	1.0
2	22.1	84%	3% (glucose)	2.1	16.8	5.1
4	9.3	86%	0	1.4	17.1	2.2
5	17.2	95%	0	1.7	19.0	4.0

Example 16**Enzymatic Stability During Storage in Detergent Base with Bleach for Granules Prepared from Concentrate containing Cell Components and Insoluble Enzyme**

[270] Enzyme granules prepared as described in examples 1, 2, 4 and 6 were evaluated for storage stability in detergent base IEC A* with bleach powder. The IEC A* powder detergent was purchased from WFK and does not contain bleach agents. The following bleach system was added: 3 % TEAD, and 20% perborate.2H₂O. The storage conditions used were 37°C in 70% Relative Humidity chamber with samples placed in open polypropylene containers. Residual activity was measured and calculated based on initial activity. The data is shown in Figure 2.

Example 17**Preparation of clarified enzyme solution from fermentation broth containing enzyme crystals**

[271] All operations were performed at room temperature.

Starting Material

[272] A *Trichoderma reesei* strain engineered to express an aspartic protease was fermented under standard conditions known in the art. For example, see U.S. Patent No. 7,429,476. The pH of the fermentation broth at the time of harvest was 4.62 and the enzyme had formed large crystals with 98% of the total activity in the spindown.

Filtration 1 – Recovery of Protease Crystals

[273] 521 g of harvest broth was blended in a beaker with 63 g of diatomaceous earth filter aid, Celatom FW-6. 302 g of the blend was filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Nalgene 154-0045). 155 g filtrate and 146 g filter cake were recovered. 98% of the enzyme activity was retained in the filter cake. The filtrate was discarded.

Crystal Solubilization

[274] 131 g of filter cake from the previous step was transferred into a beaker and blended with 87 g of 50 mM sulfuric acid. After standing for 45 minutes at room temperature, the blend had a pH of 3.2 and a microscope confirmed that all protease crystals had dissolved.

Filtration 2 – Clarification of Protease Solution

[275] 184 g of the crystal solubilization blend from the previous step was filtered on the same type of filter used in filtration 1. Filtrate was displaced from the sedimented solids by chasing with 50 g of water when the cake surface fell dry. 154 g of filtrate was collected and 80 g of filter cake were discarded. The clear filtrate contained 88% of the starting enzyme activity at a titer that was 16 % higher than that of the starting broth.

Example 18**Clarified Enzyme Formulation Preparations****Starting Material: Bacterial Fermentation Broth**

[276] *Bacillus licheniformis* that recombinantly expresses α -amylase enzyme was fermented using well-known techniques in the art. After fermentation, the broth was lysed using 0.01% (w/w) lysozyme for 2 hrs, followed by heat treatment at 60°C for 2hr.

18.1 Preparation from Broth containing Soluble Enzyme (conventional recovery)

[277] 5g of starting material was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min to separate the solid phase from the liquid phase. The supernatant contained 88% of the enzyme activity. The purity by dry solids was 6%. The purity by total protein was 14%.

18.2 Preparation from Broth containing Insoluble Enzyme**Crystallization of α -Amylase Enzyme in Lysate**

[278] 40g of the starting material was used. The pH of the lysate was adjusted to 5 using 20% acetic acid. The pH adjusted was incubated in a shaker: 50°C and 80rpm shaking.

Centrifugation #1 – Recovery of α -Amylase Crystal and cell debris

[279] After 44 hours of incubation, 5 g of lysate was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min to separate the solid phase from the liquid phase.

Solubilization of α -Amylase Crystals

[280] The solids recovered were resuspended in tap water to reach the original lysate weight of 5 g. 3 g of propylene glycol was added to the suspension. The pH was adjusted to 6.5 using 5% NaOH and mixed by inversion at room temperature for 18 hr. The mixture was then incubated at 40°C for 2 hrs.

Centrifugation #2 – Clarification of Amylase Solutions

[281] The crystal solubilization blend was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min to separate the solid phase from the liquid phase. The resulting centrate (liquid supernatant) was further clarified using a 0.45 μ m syringe filter. The clear amylase solution contained 85% of the activity found in initiate lysate used for crystallization. The purity by dry solids was 42%. The purity by total protein was 34%.

18.3 Preparation from Broth containing Insoluble Enzyme using Flocculation

Flocculation

[282] 10g/L of C581 cationic polymer was added to 5 g lysate containing dissolved α -amylase crystals from Example 18.2 and then mixed gently by manual inversions 10 times.

Centrifugation #2 – Clarification of Amylase Solutions

[283] The flocculated crystal solubilization blend was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min to separate the solid phase from the liquid phase. The clear centrate contains 85% of the activity found in initiate lysate used for crystallization. The purity by total protein was 39%.

[284] The purities of α -amylase solutions recovered as described in the examples 18.1, 18.2, and 18.3 are presented in Table 5. Enzyme purity was calculated by dividing the enzyme activity by the total amount of dry solids or by dividing by the total protein concentration.

Table 5: Clarified Enzyme Solution Properties

Example	Enzyme Purity by Dry Solids	Purification Relative to Example 18.1	Enzyme Purity by Total Protein	Purification Relative to Example 18.1
18.1	6%	1.0	14%	1.0
18.2	42%*	7.4	34%	2.4
18.3			39%	2.7

* Excluding contribution by propylene glycol

5

[285] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of
10 illustration and examples for purposes of clarity of understanding, it will be apparent to those skilled in the art that certain changes and modifications may be practiced without departing from the spirit and scope of the invention. Therefore, the description should not be construed as limiting the scope of the invention.

[286] All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated
15 by reference in their entireties for all purposes and to the same extent as if each individual publication, patent, or patent application were specifically and individually indicated to be so incorporated by reference.

CLAIMS

We claim:

1. A method for recovering an insoluble enzyme from a microbial broth that comprises
5 microbial cells and/or cell debris from microbial cells, said method comprising recovering insoluble enzyme from the microbial broth without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth
- 10 2. A method according to claim 1, wherein said microbial broth is produced by a method selected from:
blending an enzyme with a microbial broth that comprises microbial cells and/or cell debris, wherein said enzyme is not produced by said microbial cells, and wherein said enzyme is insoluble in said microbial broth or wherein said enzyme is soluble in said microbial broth and
15 said method further comprises rendering at least some of said enzyme insoluble by addition of a precipitant;
adding a precipitant to a microbial broth comprising a soluble enzyme expressed by said microbial cells, thereby causing at least some of the enzyme to become insoluble; and
expressing an enzyme in microbial cells in a fermentation medium, wherein at least some
20 of the enzyme is insoluble in the fermentation medium.
3. A method according to claim 1, wherein said recovering comprises at least one recovery operation selected from broth conditioning; cell lysis; homogenization; diafiltration; and solid-liquid separation,
25 wherein when said recovering comprises two or more of said recovery operations are performed, said recovery operations may be performed in any order.
4. A method according to claim 1, wherein said recovering comprises removing at least part of the liquid phase from the microbial broth.
- 30 5. A method according to claim 4, wherein removing at least part of the liquid phase from the microbial broth comprises concentrating the microbial broth.

6. A method according to claim 5, wherein concentrating the microbial broth comprises a membrane filtration process selected from ultrafiltration, microfiltration, reverse osmosis, and nanofiltration.
- 5 7. A method according to claim 4, wherein removing at least part of the liquid phase from the microbial broth comprises a process selected from rotary drum vacuum filtration, plate and frame filtration, belt filtration, centrifugation, cyclone separation, decantation, and evaporation.
8. A method according to claim 1, wherein said insoluble enzyme is produced by adding a
10 precipitant to a microbial broth comprising a soluble enzyme, thereby rendering at least some of the enzyme insoluble in the microbial broth, wherein the precipitant is selected from adjustment of pH, adjustment of temperature, addition of salt, addition of acid, addition of base, addition of at least one other protein, addition of buffer, and addition of polyelectrolyte, or a combination thereof.
- 15 9. A method according to claim 1, wherein the composition comprising recovered insoluble enzyme comprises intact microbial cells.
10. A method according to claim 9, wherein the intact microbial cells are live microbial cells.
- 20 11. A method according to claim 9, wherein the intact microbial cells are dead microbial cells.
12. A method according to claim 1, wherein said microbial broth comprising microbial cells
25 and/or cell debris comprises a microbial cell lysate, wherein said microbial cell lysate is produced by disrupting microbial cell membranes.
13. A method according to claim 9, wherein the method further comprises disrupting
30 microbial cell membranes of the intact microbial cells to produce a microbial cell lysate comprising the recovered insoluble enzyme.
14. A method according to claim 12 or 13, wherein disrupting microbial cell membranes comprises contacting microbial cells with an enzyme that is capable of microbial cell lysis.

15. A method according to claim 14, wherein the enzyme that is capable of microbial cell lysis is a lysozyme enzyme.
- 5 16. A method according to any of claims 12 or 13, wherein disrupting microbial cell membranes comprises a mechanical shear process selected from homogenization; high shear mixing; pressure extrusion; and high shear pumping.
- 10 17. A method according to claim 12 or 13, further comprising homogenizing the microbial cell lysate to produce a homogenized microbial cell lysate.
18. A method according to claim 17, further comprising diafiltering the microbial cell lysate.
19. A method according to claim 1, wherein the microbial cells are bacterial cells.
- 15 20. A method according to claim 19, wherein the bacterial cells are *Bacillus* cells.
21. A method according to claim 20, wherein the *Bacillus* cells are *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis* cells.
- 20 22. A method according to claim 1, wherein the microbial cells are fungal cells.
23. A method according to claim 22, wherein the fungal cells are *Trichoderma* cells.
- 25 24. A method according to claim 23, wherein the *Trichoderma* cells are *Trichoderma reesei* cells.
25. A method according to claim 1, wherein at least about 10% of the enzyme is insoluble in the microbial broth.
- 30 26. A method according to claim 1, wherein the purity of the insoluble enzyme is increased by at least about 10% in comparison with the purity of the insoluble enzyme prior to said recovering.

27. A composition produced according to the method of claim 1, wherein said composition comprises recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris.

5 28. A composition according to claim 27, further comprising at least one formulation ingredient.

29. A method for producing a clarified liquid enzyme solution comprising
(a) providing a composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell
10 debris;

(b) solubilizing at least part of the insoluble enzyme by adding one or more substances that dissolve the enzyme and/or by changing the physical conditions such that the enzyme dissolves at least partially, thereby producing a soluble enzyme solution; and

(c) removing the solids from the solution prepared according to step (b), thereby
15 producing a clarified liquid enzyme solution.

30. A method of making an enzyme-containing granular formulation, comprising producing an enzyme-containing granule that comprises a composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris.

20 31. A method according to claim 30, wherein said composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth comprising microbial cells and/or cell debris without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered
25 insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth.

32. A method according to claim 30, wherein the enzyme-containing granule is produced by a granulation process selected from top-spray fluid bed processing; bottom spray Wurster coater
30 processing; high shear granulation; extrusion; and pan coating.

33. A method according to claim 30, comprising coating an enzyme-containing layer comprising said insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris onto a core in a top-

spray fluid bed processor, wherein said method optionally comprises coating a salt layer between said core and said enzyme-containing layer.

34. A method according to claim 33, further comprising coating a layer comprising a barrier
5 salt over said enzyme-containing layer.

35. A method according to claim 34, further comprising coating an outer coating layer
comprising a polymer and/or pigment over said barrier salt layer.

10 36. A method according to claim 30, wherein said enzyme containing granule is produced by
coating a barrier salt layer and/or one or more coating layers over an enzyme-containing core
comprising said insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris.

37. A method according to claim 36, wherein said enzyme-containing core is produced by
15 top-spray fluid bed processing.

38. A method according to claim 36, wherein said enzyme-containing core is produced by
high shear granulation.

20 39. An enzyme-containing granule comprising:
a core;
optionally, a salt layer coated over the core; and
an enzyme-containing layer coated over the core or salt layer, wherein said enzyme-
containing layer comprises a composition comprising insoluble enzyme and microbial cells
25 and/or cell debris.

40. An enzyme-containing granule according to claim 39, wherein said composition
comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method
comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth comprising microbial cells
30 and/or cell debris without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a
composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris,
wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth.

179

41. An enzyme-containing granule according to claim 39, further comprising a barrier salt layer coated over said enzyme-containing layer.

42. An enzyme-containing granule according to claim 39, further comprising an outer coating layer coated over said barrier salt layer, wherein said outer coating layer comprises a polymer and/or pigment.

43. An enzyme-containing granule comprising an enzyme-containing core and a barrier salt layer and/or one or more coating layers surrounding the core, wherein said core comprises a composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris.

44. An enzyme-containing granule according to claim 43, wherein said composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth comprising microbial cells and/or cell debris without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth.

45. An enzyme-containing granule according to claim 43, wherein said enzyme-containing core is produced by top-spray fluid bed processing.

46. An enzyme-containing granule according to claim 43, wherein said enzyme-containing core is produced by high shear granulation.

47. A detergent composition comprising the enzyme-containing granule of any of claims 39 to 46.

48. A textile processing composition comprising the enzyme-containing granule of any of claims 39 to 46.

49. An animal feed composition comprising the enzyme-containing granule of any of claims 39 to 46.

50. A food composition comprising the enzyme-containing granule of any of claims 39 to 46.

51. An enzyme-containing liquid formulation comprising a composition comprising an insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris.

5

52. A liquid formulation according to claim 51, wherein said composition comprising insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris is produced by a method comprising recovering insoluble enzyme from a microbial broth without removing the microbial cells and/or cell debris, thereby producing a composition comprising recovered insoluble enzyme and microbial cells and/or cell debris, wherein at least some of the enzyme is insoluble in the microbial broth.

10

53. A liquid formulation according to claim 51, further comprising one or more formulation ingredients selected from a polyol; a salt; a preservative; a surfactant; and an antioxidant.

15

FIGURE 1

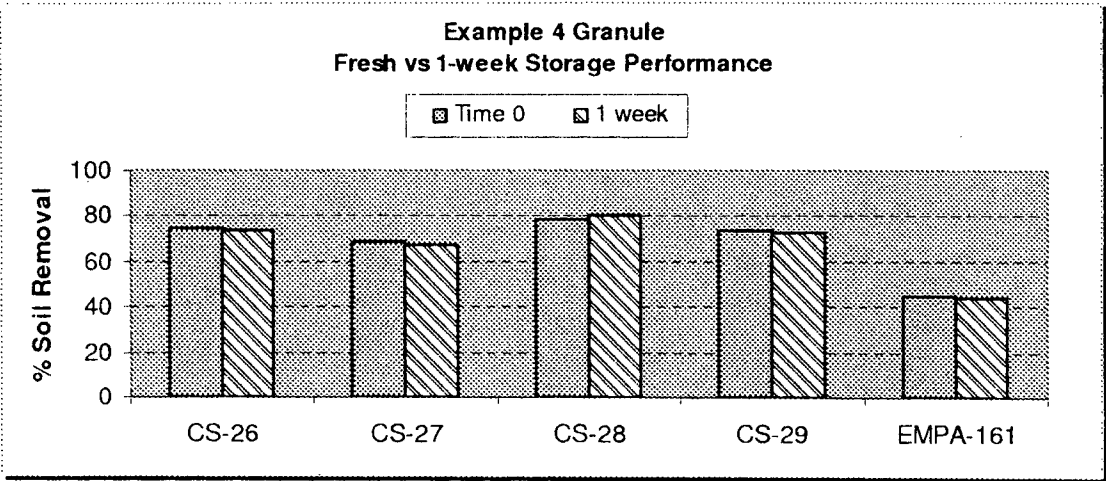
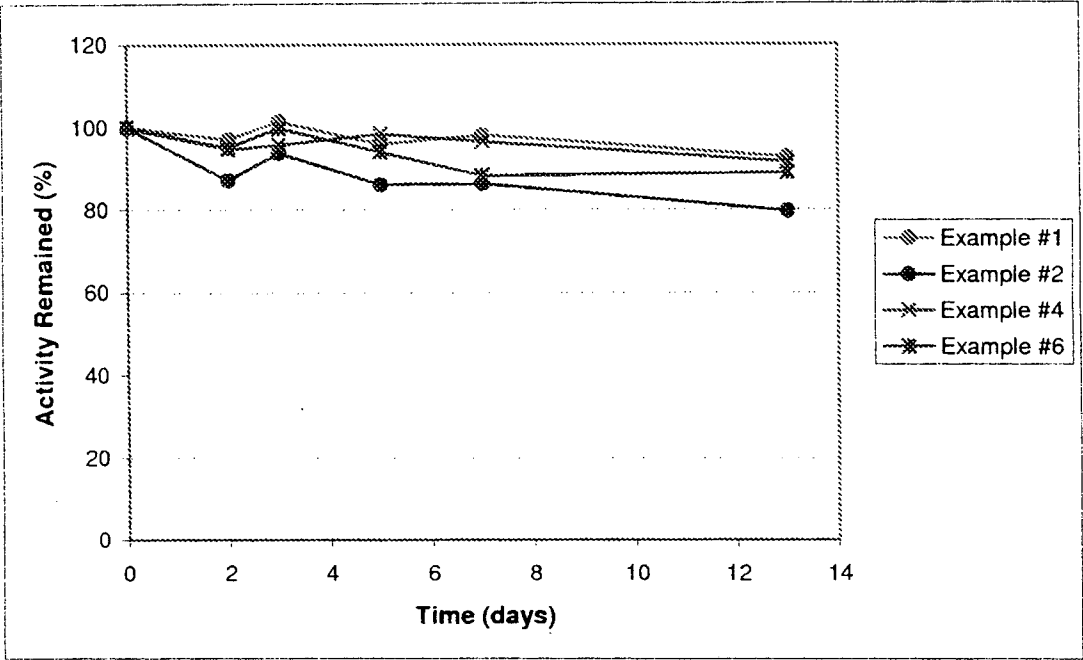
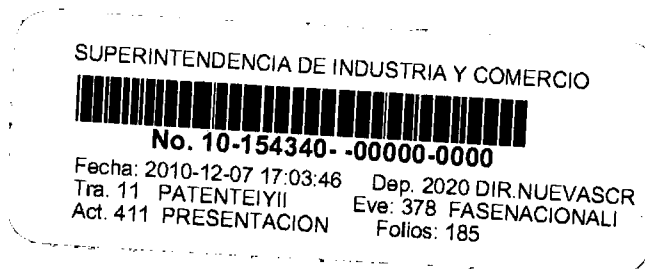


FIGURE 2



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 104,547
FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383679494	07/12/2010	19,322,000.00

***** CONCEPTO *****

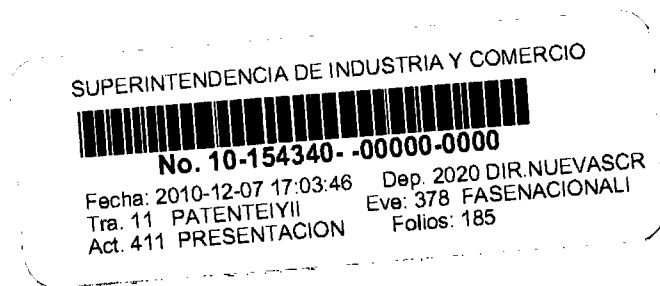
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

184



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 104,548
FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383679494	07/12/2010	19,322,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
43	50005-01-01	SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL
			TOTAL : \$ 1,118,000.00
			1,119,000.00

SON: UN MILLON CIENTO DIEZ Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

185



No. 10-154340- -00000-0000

Fecha: 2010-12-07 17:03:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒
☒
☒
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CASTILLO BONILLA JERONIMO
Apoderado(a) y/o Representante de
DANISCO US INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 154340
	Solicitud internacional	PCT/US2009/046783
	Fecha inicio fase nacional	09/01/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0 2 2 1 4

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

11 FEB. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11