

JE.

26 83 97



PATENTE DE INVENCION

a favor de

MERCK & CO., Inc., de nacionalidad norteamericana, domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln Avenue,

por:

"Procedimiento para depilar pieles y prepararlas para su curtición".

Memoria descriptiva.

Este invento se refiere a la preparación de las pieles de animales para curtir, incluida la depilación de las mismas.

De conformidad con los métodos actuales, los pellejos y pieles de animales se remojan primero en agua



fría durante dos o tres días, para rehidratarlos y eliminar la sal, la sangre, la suciedad y parte de las proteínas interfibrilares. Luego se descarnan, eliminando la capa de tejido subcutáneo. Las pieles se encalan a continuación en baños que contienen cal hidratada, con diversos activadores o sin ellos, durante dos a cinco días. Así se destruye la epidermis y se afloja el pelo, que se elimina mecánicamente. Las pieles depiladas e hinchadas por el álcali se desencalan después por inmersión en soluciones débiles de diversas sales de amonio o de ácidos poco enérgicos, para reducir la hinchazón y ajustar el pH alrededor de 8-9, que es el favorable para el adobo. Las operaciones de adobo, que comprenden el empleo de tripsina pancreática u otras enzimas similares de diversas procedencias, duran de dos a 24 horas, según el tipo de pieles y el cuero que interesa obtener. Su principal función parece ser eliminar diversos productos de degradación de las proteínas, a fin de dejar una piel abierta y flácida apropiada para curtirla.

De conformidad con el presente invento, se ha descubierto un nuevo método enzimático que simplifica mucho la preparación de las pieles para la curtición.

En consecuencia, un objeto de este invento es proporcionar un método sencillo, económico y eficaz para preparar directamente las pieles de animales para curtirlas.

Se ha comprobado ahora que el depilado de las pieles de animales mediante el uso de cal hidratada sola, o de cal con diversos activadores, puede suprimirse empleando una preparación de enzima proteolítica producida por



efecto de la actividad microbica de varios cultivos de Streptomyces y bacterianos.

5 Esta enzima proteolítica, que se ha aislado y caracterizado, se ha denominado queratinasa por su propiedad de digerir la queratina natural, no alterada. Su producción, aislamiento y caracterización se describen en la patente alemana nº 1.090.673.

10 Como se describe en dicha patente, la encima tiene una composición eficaz para digerir una cantidad importante de material queratinoso, incluida la proteína digerible por la tripsina contenida en ese material y una cantidad apreciable de la proteína queratina del mismo no digerible por la tripsina. La enzima proteolítica citada se caracteriza: a, por ser hidrosoluble; b, por no ser dializable; c, por perder su capacidad de digerir la queratina calentándola a unos 100° durante cinco minutos; d, por mostrar su capacidad máxima de digerir la queratina a un pH aproximado de 8,5-9,5; e, por ser precipitable de una solución acuosa, mediante adición de sulfato amónico; y f, porque su capacidad de digerir la queratina depende de la presencia de indicios, por lo menos, de iones metálicos secuestrables (quelables).

15 El empleo de la enzima queratinasa aquí considerado se traduce en un procedimiento muy económico, pues es posible depilar las pieles animales curadas, incluso las de pelo fino, sin necesidad de elementos mecánicos específicos, y prepararlas para la curtición eliminando el baño de cal y las operaciones de desencalar y adobar. Además, depilando con la enzima queratinasa, se dañan menos
25 el pelo y la lana, y se obtienen así subproductos en mejores condiciones y más valiosos.
30



Las pieles obtenidas después del tratamiento con estas preparaciones microbicas de enzima queratinasa son blandas o flácidas al tacto, de blandura suficiente para retener, como prueba corriente, la impresión del dedo pulgar. Además, estas pieles presentan un grano liso y limpio, somero o aplanado, bastante abierto para que el agua y el aire pasen a través de la estructura fibrosa con facilidad al estrujarlos con la mano.

En el presente procedimiento, el tratamiento de las pieles puede efectuarse con cualquiera de varios tipos diferentes de preparaciones de queratinasa, entre ellos caldos o líquidos filtrados ricos en enzimas, concentrados o sin concentrar; polvos desecados, obtenidos de concentrados mediante adición de harina de madera u otros materiales inertes o cargas, con desecación subsiguiente a temperaturas inferiores a 40°C, o polvo seco preparado directamente de líquido filtrado rico en enzimas. Las preparaciones enzimáticas de mayor pureza y actividad obtenidas por las técnicas corrientes de disolución o de precipitación sirven así mismo para el caso; sin embargo, el procedimiento preferido impone el uso de preparaciones enzimáticas relativamente crudas. Se calcula que la cantidad de enzima requerida variará con la pureza de las preparaciones, la relación entre la piel y el agua, la piel tipo, la rapidez con que hayan de tratarse las pieles, y la presencia o ausencia de activadores adecuados de enzimas, mencionados más adelante.

En una forma específica de realización, las preparaciones enzimáticas que contienen queratinasa se elaboran por un procedimiento descrito en la patente alemana número



1.090.673 ya mencionada. Aunque este método no forma intrínsecamente parte del presente invento, se describe ahora en términos breves para dar una idea completa y detallada de cómo puede prepararse este material.

5 El material de enzimas proteolíticas que contiene queratinasa puede producirse tratando diversos materiales queratinosos con microorganismos en condiciones tales que faciliten la degradación, y que los productos de ésta sean hidrosolubles. Esos gérmenes comprenden los Streptomyces fradiae, Str. griseus, Str. griseoluteus, Str. rimosas y Str. parvus, y se describen en las páginas 97, 10 87, 52, 47 y 46, respectivamente de "Actinomyces and their Antibiotics", por Waksman y Lechevalier. Se han depositado cepas de estos microorganismos en la colección de cultivos del Instituto de Microbiología de Rutgers, 15 Universidad del Estado, Nueva Brunswick, Nueva Jersey, y todos los números citados en adelante corresponden a los de esa colección. Una cepa de Str. fradiae que ha resultado especialmente útil para preparar la enzima querati- 20 nasa es el nº 3739, aislado del suelo, que ha demostrado pertenecer a esa especie.

Materiales queratinosos apropiados para su tratamiento en esta forma son, por ejemplo, pelos de animales, pezuñas de reses sacrificadas, plumas de pollos, escamas de peces, etc. El tratamiento de este material queratinoso para obtener queratinasa se efectúa muy bien en 25 una solución acuosa que contenga sales inorgánicas, la cual, para obtener los mejores resultados durante la fermentación, han de tener un pH aproximado de 6,5 a 8,8, y con preferencia de 7,2 a 8,5. Debe advertirse que el pH 30



asciende en el curso de la fermentación. Puede regularse el pH mediante un atemperante o tope adecuado. En un lapso de tres a cinco días, después de aireación y agitación apropiadas, el caldo fermentado rico en enzimas queda en condiciones de ser recogido y recuperado.

La enzima resultante es un fermento proteolítico capaz de digerir la queratina natural no alterada contenida en el material queratinoso, y de liberar de la misma los polipéptidos hidrosolubles. Se caracteriza además por no ser dializable, desnaturalizarse mediante el calor, y precipitar con alcohol, acetona y sulfato amónico; no requiere tratamiento previo de la queratina con material que contenga grupos sulfhidrilo o con agentes reductores, para funcionar como medio capaz de digerir la queratina.

El presente procedimiento de tratar las pieles es aplicable a pieles remojadas o no, y conservadas por secado, saladura o cualquier otra técnica. Se ha comprobado, sin embargo, que el pelo se puede ahuecar y eliminar con concentraciones bajas de enzima queratinasa, y en menos tiempo, utilizando pieles remojadas y descarnadas como materia prima. Los tiempos de tratamiento varían en general entre 12 y 24 horas.

Aunque las pieles remojadas, descarnadas o sin remojar, saladas en crudo, endurecidas o secadas al aire, pueden ponerse en un "paddle" o cuba provista de agitador, con una solución de la enzima proteolítica queratinasa, a una concentración de 1:3 a 1:6 en agua, se obtienen muy buenos resultados colocándolos en un cilindro o tambor en el que pueden revolverse durante parte del periodo de tratamiento, a una concentración de 1:0,5 a 1:2 en agua. En es-



En las condiciones preferidas, la depilación es eficaz, incluso la de los pelos finos, que normalmente se quitan muy difícilmente de la piel, a no ser por medios mecánicos.

5 Para que sea máxima la actividad de la enzima queratinasa presente, el pH debe mantenerse entre 7,0 y 10,0 y con preferencia entre 8,5 y 9,5 aproximadamente. El pH se ajusta añadiendo sustancias alcalinas tales como borato sódico, NaOH, Na₂CO₃, K₂HPO₄, cal hidratada u otros atemperantes adecuados, si se quiere. La cantidad de álcali requerida varía, como es natural, según el peso, tipo
10 y procedencia de las pieles, la dureza del agua y el compuesto alcalino utilizado.

Como todas las demás reacciones enzimáticas, la rapidez del tratamiento de las pieles con la enzima queratinasa aquí empleada es función de la temperatura del mismo. Se ha comprobado que la depilación y la preparación
15 de las pieles puede efectuarse a temperaturas entre 20° y 40°C, pero es preferible hacerlo a temperaturas de 25° a 35°C, en principio, porque estas temperaturas se pueden
20 mantener sin necesidad de un manantial exterior de calor. Empleando temperaturas más altas, de 30° a 40°, el tratamiento de las pieles se acelera, pero hay que calentar el baño enzimático.

La agitación de la solución de enzima y de las
25 pieles hace más rápidas y uniformes su depilación y su preparación.

La acción combinada de la preparación de enzima cargada de queratinasa y de la agitación sirve para eliminar el pelo de las pieles. El pelo se puede recuperar fácilmente
30 de la solución de enzimas, mediante técnicas usuales.



El pelo recuperado, después de lavarlo, se encuentra en un estado apropiado para ser empleado directamente, y la piel queda lista para su apresto y su curtición sin subsiguiente adobo.

5 Pueden añadirse diversas sales neutras como activadores para acelerar la depilación y la preparación de las pieles y emplear concentraciones más bajas de enzima. Entre estas sales se cuentan NaCl , KCl , Na_2SO_4 y MgSO_4 , que pueden aplicarse a concentraciones de 0,05 a 5,0%, y
10 con preferencia de 0,1 a 0,5%. Con pieles saladas en crudo, no es necesario añadir un activador neutro. También es posible añadir activadores reductores tales como NaSH , NaHSO_3 y sales del ácido tioglicólico, por ejemplo, tioglicolato sódico, pero esto no es esencial.

15 El tiempo requerido para efectuar este procedimiento varía naturalmente con la temperatura, el pH, la concentración de enzima y su actividad, la presencia de activadores y otras variables. Pero es obvio que en el presente procedimiento se pueden preparar en 12 a 24 horas
20 las pieles para curtiñas, incluida la depilación.

 Los estabilizadores o desinfectantes empleados para prevenir cualquier desarrollo perjudicial de gérmenes durante el procedimiento, se añaden en cantidad aproximada de 0,2 a 1 parte por 1000 de solución de enzima, y comprenden compuestos tales como fenol y diversos derivados
25 de esta substancia, ácido cresílico, naftol beta, esencia de pino y otros preservadores corrientes.

 El pelo que se quita de la piel durante el tratamiento enzimático se recupera fácilmente del líquido fermentativo por decantación, filtración u otras técnicas apropiadas al caso.
30



Las cantidades de las diversas preparaciones enzimáticas cargadas de queratinasa utilizables para esta depilación y preparación de las pieles varia con la actividad de cada una de ellas y el peso y la extensión superficial de las pieles. Una unidad de queratinasa, según se define aquí, es la de enzima capaz de digerir queratina de madera hasta producir un aumento de densidad óptica de 0,040 a 280 milimicras (2800 Å) en tres horas, con un pH de 8,6. Por tanto, el peso de una preparación de enzimas que produzca este efecto variará con la pureza y la actividad de la preparación. Por ejemplo, en una preparación de caldo desecado, hay una unidad de queratinasa por 100 pg. de material, poco más o menos, mientras que en una preparación obtenida precipitando con sulfato amónico, 10 pg. del precipitado contienen una unidad de queratinasa. Para el tratamiento económico y eficaz aquí descrito de pieles para curtirlas, la actividad de la queratinasa debe variar entre 100 y 1100 unidades por mililitro, y la relación entre las pieles y el agua oscila entre 1:0,5 y 1:2; se prefiere una actividad de 100 a 500 unidades de queratinasa por mililitro cuando la relación entre las pieles y el agua es de 1:2.

Como ilustración, pero sin limitar por ello el presente invento, se exponen los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 19

Dos trozos aproximadamente iguales de piel de bovino salado en frío, con un peso total de 65,2 g., se lavaron durante media hora en una cantidad de agua igual a cuatro veces su peso, sin agitar; se enjuagaron, y se tuvieron en remojo durante la noche a temperatura ambiente



en una cantidad de agua igual a unas cuatro veces su peso. Los trozos de piel se suspendieron luego dentro de un tambor en 130,4 ml. de agua a 28°C, que contenía 0,75% de bórax y preparación cruda de queratinasa suficiente para obtener una concentración de 274 unidades de queratinasa por mililitro. El pH inicial de la solución era de 9,01. Se hizo girar el tambor a 10 r.p.m. para distribuir por igual la preparación enzimática sobre los trozos de piel, y luego se mantuvo a 28°C durante 24 horas. Al cabo de unas 6 horas, el tambor se hizo girar a unas 10 revoluciones. El pH final de la solución era de 8,52 aproximadamente.

Transcurridas las 24 horas, se había desprendido todo el pelo de uno de los trozos, incluso el fino. La acción depilante en el segundo trozo era casi tan completa en la mitad sumergida en la solución, pero insignificante en el resto, no sumergido por alguna razón mecánica. El primer trozo de piel se lavó durante diez minutos a unos 27°C, y luego otros diez minutos a unos 18°C; así quedó limpio y dispuesto para su curtición.

EJEMPLO 2º

Dos trozos aproximadamente iguales de una piel de bovino salada en crudo, con un peso total de 75,5 g., se lavaron durante media hora en una cantidad de agua igual a unas cuatro veces su peso, sin agitación; se enjuagaron, y se remojaron durante la noche, a temperatura ambiente, en una cantidad de agua igual a unas cuatro veces su peso. Luego se suspendieron en un tambor en 75,5 ml. de agua que contenía 0,75% de bórax y preparación cruda de queratinasa suficiente para obtener una concentración de 548 uni-



dades de queratinasa por mililitro. El pH inicial de la solución era de 8,88. Se hizo girar el tambor a 10 r.p.m., para distribuir bien la preparación enzimática sobre los trozos de piel, y se mantuvo luego a 28°C durante 24 horas. Al final de las primeras seis horas, el tambor se hizo girar a unas 10 revoluciones. El pH final de la solución era de 8,10.

Al término de las 24 horas, estaba completamente desprendido el pelo de cada uno de los trozos de piel, incluso el fino. Los dos trozos se lavaron diez minutos a unos 27°C, y luego otros diez minutos a unos 18°C. Después quedaron limpios y dispuestos para curtirlos.

EJEMPLO 3º

Dos flancos de piel de res bovina remojados y descarnados se suspendieron en un tambor en relación de 1:2 en agua que contenía 1,5% de bórax y preparación cruda de queratinasa para obtener una concentración de 275000 unidades de queratinasa por libra de piel remojada y descarnada (equivalente a unas 300 unidades de queratinasa por mililitro de solución, con una relación de 1:2 entre la piel y el agua). La solución tenía al principio una temperatura de 32°C y un pH aproximado de 9,2.

Se hizo girar el tambor a 10 r.p.m., y luego se tuvo parado durante una hora. Este ciclo se repitió una vez, seguido de otro a 10 revoluciones y cuatro horas de inmovilidad durante el resto del periodo de tratamiento. Después de un total de 21 horas, la temperatura de la solución era de 27°C, y el pH de 8,7, y se había desprendido de las pieles todo el pelo, incluso el fino.

Una vez secas, las pieles estaban dispuestas para su curtición.



26 83 97

EJEMPLO 4º

Ocho flancos de pieles de bovino, remojados y descarnados, con un peso aproximado de 73 kg., se suspendieron en un tambor, en una relación entre la piel y el agua de 1:2, conteniendo el agua 1,5% de bórax y 1470 ml. de preparación cruda de queratinasa a una concentración aproximada de 30.000 unidades de queratinasa por mililitro, (equivalente a unas 300 unidades de queratinasa por mililitro de solución, a una relación de 1:2 entre la piel y el agua). La solución tenía al principio una temperatura de 31°C y un pH de 9,18.

Se hizo girar el tambor dos minutos, y se mantuvo inmóvil una hora, seguida de un minuto de rotación y una hora de inmovilidad; luego se sometió a un ciclo de un minuto de rotación y cuatro horas de reposo durante el resto del periodo de tratamiento. Después de 22 horas, la temperatura de la solución era de 24°C, y el pH de 8,5; todo el pelo se había desprendido de la piel, incluso el fino, y la piel estaba muy limpia, sin celajes. Después de descargar la solución enzimática del tambor y reemplazarla por agua limpia a 27°C, y de hacer girar el tambor durante diez minutos para lavar las pieles, éstas quedaron listas para curtirlas.

EJEMPLO 5º

Se pusieron en un tambor 93 pieles de cabra de Nigeria, con un peso aproximado de 91 kg. ya remojadas, revueltas y batidas del modo usual, y se lavaron durante veinte minutos con agua a 35°C. Después de verter el agua de lavado, las pieles se suspendieron en el tambor en relación de 1:2 entre la piel y el agua, cuya temperatura



al principio era de 35°C. Se añadieron 2,84 kg. de bórax para ajustar el pH inicial de la solución a 9,0, y se añadieron a la solución contenida en el tambor unos 1900 ml. de una preparación cruda de queratinasa a unas 30.000 unidades por mililitro. (Esto equivalía a unas 310 unidades de queratinasa por mililitro de solución en relación de 1:2 entre la piel y el agua). Se hizo girar el tambor durante cinco minutos, se tuvo una hora parado, volvió a moverse dos minutos y a pararse dos horas, seguidas de dos minutos de rotación, tres horas de reposo, dos minutos de rotación, y reposo durante la noche a 35°C. A la mañana siguiente, se hizo girar durante siete minutos, se paró una hora, giró dos minutos y se dejó inmóvil media hora. El tiempo total de tratamiento con queratinasa fué de veinte horas, el pH final era de 8,6, y se había desprendido todo el pelo, incluso el fino y el denso de los cuellos.

Después de lavar las pieles durante veinte minutos a 32°C, las pieles estaban dispuestas para su curti-ción.

La preparación cruda de queratinasa empleada al efectuar cada uno de los ejemplos precedentes provenía de la acción de Streptomyces fradiae H.M. nº 3739 en un medio nutritivo de solubles de destilerías y harina de pezuñas, atemperado con fosfato dipotásico, y que contenía indicios de sulfato de cinc, sulfato ferroso, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y nitrato de cobalto.



N O T A

Se reivindica como objeto de esta patente:

1) Procedimiento para depilar pieles y preparar-
las para su curtición, que consiste en sumergir las pie-
5 les, sin tratarlas previamente para degradar la proteína
queratina que contiene, en una solución acuosa en el in-
terior de un tambor giratorio, estando la piel y el agua
en una relación de 1:0,5 a 1:2; y cuya solución acuosa
contiene una enzima proteolítica capaz de digerir una can-
10 tidad substancial de material queratinoso, incluida la
proteína digerible por la tripsina que contenga dicho ma-
terial, así como una cantidad importante de la proteína
queratina del mismo material no digerible por la tripsina;
estando caracterizada dicha enzima proteolítica: a) por
15 ser hidrosoluble; b) por no ser dializable; c) porque su
capacidad de digerir la queratina se destruye calentando
a unos 100°C durante cinco minutos; d) porque su capaci-
dad máxima para digerir la queratina corresponde a un pH
de 8,5 a 9,5, aproximadamente; e) por ser precipitable de
25 una solución acuosa mediante adición de sulfato de amonio;
y f) porque su capacidad de digerir la queratina depende de
la presencia de indicios por lo menos de iones metálicos
quelables, presentando dicha solución una actividad de
queratinasa de 100 a 1100 unidades por mililitro; hacién-
30 dose girar el tambor a intervalos con las pieles en su in-
teripr, obteniéndose la depilación de las pieles en la
solución, las cuales pierden hasta los pelos finos.

2) Procedimiento según la reivindicación anterior,
que consiste en sumergir las pieles directamente, sin tra-
30 tamiento intermedio con álcalis, en una solución acuosa de



enzima proteolítica, según una relación entre la piel y el agua de 1:0,5 a 1:2, cuya enzima se caracteriza por su capacidad de digerir la queratina natural no alterada, y se deriva del tratamiento de un material queratinoso por una cepa de Streptomyces fradiae; presentando dicha solución una actividad de 100 a 1100 unidades de queratinasa por mililitro, y manteniéndose a una temperatura de 20º a 40ºC, y un pH de 8,5 a 9,5, durante un tiempo aproximado de 12 a 24 horas, mientras se hace girar el tambor a intervalos, para obtener la depilación de las pieles en la solución, que pierden hasta el pelo fino, sin daño ninguno para las mismas ni para el pelo desprendido de ellas; y retirar las pieles de la citada solución en condiciones apropiadas para aprestarlas y curtirlas.

3) Procedimiento para depilar pieles y prepararlas para su curtición.

Esta memoria consta de quince páginas escritas por una sola cara.

BARCELONA, - 6 JUN 1961

P. A.