



282153



tes de tipo práctico. Sucede también que, no habiendo frecuentemente en ciertos mercados material queratinoso triturado en forma de polvo fino, que es lo necesario para su inmediata utilización en los medios de cultivo, es preciso prepararlo por molienda previa, hasta grado finísimo, a partir de las materias primas queratinosas que en el mercado pueden encontrarse, tales como pezuñas o cuernos, plumas de ave, lana, etc.. Ahora bien, la obtención, a partir de esas materias primas, del producto molturado de material queratinoso en estado de fina división es difícil, porque la queratina se altera con facilidad durante los procesos ordinarios de molienda, como lo demuestran los olores sulfhídricos que se producen durante la molturación de queratina dura.

Entre las materias primas queratinosas existentes en el mercado, las más baratas, como son, por ejemplo, las pezuñas o los cuernos, son también las más duras y por ello las más difíciles de tratar. Las de tipo más blando, que podrían, quizás, resultar de tratamiento más fácil y más conveniente, como son, por ejemplo, el pelo, la lana, son también las más caras, especialmente porque vienen siendo ya utilizadas como materias primas para otras industrias diferentes.

Todo lo anterior, referido a utilizaciones de pequeño volumen, aun siendo inconveniente no impediría la utilización de las referidas materias primas, mas cuando se trata de utilizaciones de carácter propiamente industrial, es decir, en gran escala y con mucho volumen, las dificultades hacen el proceso poco práctico y económicamente prohibitivo.

Por ello, se ha tratado de encontrar un procedimiento mediante el cual se obtuvieran fermentos proteolíticos con acción queratolítica, en el que no fuera necesario partir del aporte de material queratinoso al caldo de cultivo. Los traba

282153



jos, investigaciones y experimentos que se han hecho en ese sentido han conducido a la invención del procedimiento que constituye el objeto para el que se solicita la presente patente.

5           En tales experimentos se han estudiado aportes muy diversos de productos naturales de origen animal o vegetal ricos en proteínas, a caldos de cultivo para producir enzimas proteolíticos con actividad queratinolítica y se ha encontrado que cuando a éstos se aportaban productos naturales con  
10 proteínas completas, es decir, con toda la secuencia de aminoácidos esenciales, incluyendo los cíclicos, los resultados, aun con las naturales diferencias cuantitativas, eran siempre satisfactorios en cuanto a la producción de caldos ricos en  
15 enzimas con acción queratolítica; demostrable tanto desde el punto de vista de la digestión de la queratina como desde el punto de vista de la depilación de pieles, que fueron las dos pruebas principales a que se sometieron.

En cambio, los rendimientos eran nulos o demasiado bajos cuando se manejaban proteínas incompletas.

20           Como ejemplo de productos naturales ricos en proteína que se han ensayado con resultado satisfactorio puede citarse: entre los vegetales, la harina y peptona de soja, y las harinas de altramuz y de alfalfa; entre los animales, la harina de escamas de pescado (de naturaleza colágena); y entre  
25 los derivados de microorganismos, la levadura de cerveza desecada y sus hidrolizados.

A continuación va a hacerse una descripción, con referencia a diversos ejemplos presentados sin carácter limitativo, del procedimiento objeto de la patente y de sus diversas  
30 fases, pero respecto a éstas importa advertir de antemano que la naturaleza y la significación de ellas no atenta en mo

282153



do alguno a la unidad del procedimiento, por cuanto se trata de variantes o complementos accidentales dentro de la esencialidad de dicho procedimiento.

Cuyas fases son:

- 5           1) Preparación de caldos de cultivo adecuados, que en el caso del invento son caldos con proteínas naturales, pero exentos de sustancias queratinosas, con o sin adición de hidratos de carbono y sales minerales complementarias a los naturalmente presentes en los aportes proteicos naturales.
- 10           2) Inoculación, en el caldo de cultivo, de los microorganismos productos de los enzimas, que en el caso del invento son precisamente microorganismos del género "Streptomyces"; y, más concretamente, el "Streptomyces fradiae".
- 15           3) Fermentación del caldo inoculado en condiciones controladas de tiempo, temperatura, agitación, aireación y pH.
- 4) Separación mecánica, del caldo de cultivo, de los productos sólidos subsidiarios a la fermentación.
5. a) Enriquecimiento del caldo enzimático.
- 20           5 b) Separación del sólido enzimático activo directamente del caldo filtrado, con o sin una previa purificación del mismo.
- 6) Purificación, bien del caldo enzimático enriquecido (5 a), bien del sólido activo separado (5 b), mediante
- 25           técnicas adecuadas y ya conocidas en la química preparativa.
- 7) Desecación final de los sólidos activos.
- 8) Corrección de los líquidos o sólidos activos purificados o no, mediante la adición de los adecuados coadyuvantes, para la mejor conservación o para la aplicación directa,
- 30           según aconsejen o exijan el uso a que se destina y las necesidades prácticas en cada caso.



282153

Es claro, como se desprende de la simple enumeración de dichas fases, algunas de las cuales son alternativas de otras, que no todas son indispensables para conseguir productos activos sino convenientes para obtener los productos con un determinado grado de pureza o dilución. Así, v.gr., terminada la fermentación (3), puede procederse a la separación directa de los sólidos (5 b) y emplearlos así, sin necesidad de la especial purificación o de la corrección de las fases 6 y 8; o, también por ejemplo, puede emplearse como digestor de queratina directamente el caldo filtrado, (de 4) sin más manipulaciones.

La más fácil compresión resultará de los siguientes ejemplos de realización ofrecidos, como se ha dicho, sin carácter limitativo.

15

EJEMPLO 1º.

A) PREPARACION DEL INOCULO

Se seguirán los sucesivos pasos para lograr un volumen conveniente de inóculo a sembrar en el fermentador final de producción.

20

Se obtiene primero un cultivo de "Streptomyces Fradiae" en frasco Roux, desarrollado durante 12 días a 28°C en el siguiente medio:

Medio de siembra.

	Peptona de soja.....	10,000	grs.
25	Extracto de carne .....	5,000	"
	Glucosa .....	5,000	"
	Cloruro de sodio .....	5,000	"
	Sulfato de zinc heptahidratado	10 partes	por millón
	Agar Bacto-Difco .....	20,000	grs.
30	Agua hasta .....	1	litro
	pH después de la esterilización entre 7,2-7,4		

282153



Para la segunda fase de crecimiento se inoculan tres asas del anterior cultivo en matraces Erlenmeyer de 1 litro, en cada uno de los cuales, se habrán preparado 300 c. c. del siguiente medio:

- 5            Medio de crecimiento
- Peptona de soja ..... 10,000 grs.
- Glucosa ..... 5,000 "
- Cloruro sódico ..... 5,000 "
- Fosfato monopotásico ..... 5,000 "
- 10           Agua c.s.p. .... 1 litro

Se ajusta el pH entre 7,0-8,0 y se esteriliza 30 minutos a 121°C.

Después de la inoculación, los matraces se incuban en una mesa de agitación de movimiento rotatorio de 220 r.p.m. a 28°C durante 48 horas.

B) FERMENTACION FINAL

Preparación del medio de cultivo.-Se prepara un caldo de cultivo con la siguiente composición:

- Harina de soja ..... 30,000 grs.
- 20           Fosfato dipotásico ..... 1,500 "
- Cloruro cálcico anhidro ..... 0,050 "
- Sulfato ferroso cristalizado.... 0,015 "
- Glucosa ..... 30,000 "
- Agua hasta ..... 1 litro

25           Se ajusta el pH para que después de esterilizar que de a 7,0-8,0.

Se prepara un fermentador de 8 litros, provisto de turbinas de agitación, sistema de aireación y agitación mecánica y las demás condiciones conocidas para efectuar una fermentación sumergida estéril, con 5 litros del caldo referido y se esteriliza durante 30 minutos a 121° C.



El medio de cultivo estéril contenido en cada fermentador, se inocula con los 300 c.c. del cultivo de "Streptomyces fradiae" del correspondiente matraz Erlenmeyer.

Una vez inoculado el fermentador se incuba a 35°C con aireación estéril, y una agitación de 600 r.p.m.

En estas condiciones la fermentación transcurre con una primera fase de crecimiento rápido del micelio en la que bajan los valores del pH a 6,5 y hay un consumo rápido del azúcar entre las 12 y las 48 horas primeras de fermentación. A partir de las 48 horas comienza a subir nuevamente el pH, sigue el consumo lento del azúcar y hay una fase más o menos estacionaria de la cantidad de micelio que comienza a disminuir a partir de las 72-84 horas, a la vez que sube más rápidamente el pH hasta llegar a valores de 8,5-8,8 a las 96-120 horas en que finaliza la fermentación, coincidiendo con una lisis del micelio y un agotamiento del azúcar.

La actividad queratinolítica del caldo, se empieza a manifestar cuando los valores del pH llegan aproximadamente a 7,0 para ir aumentando a sus valores máximos hacia el final de la fermentación.

Terminada la fermentación se filtra el caldo fermentado, eliminando los sólidos retenidos sobre el soporte filtrante.

El caldo filtrado demostró tener actividad digestora de queratina de polvo de pezuña de bovinos.

La prueba de actividad se realizó mezclando 5 c.c. del caldo filtrado con 370 mg. de polvo de pezuña finamente molida (a 200-325 mallas ASA), incubando la mezcla sobre mesas de agitación rotatoria a 35°C, durante 16 horas, y midiendo volumétricamente por centrifugación el polvo de pezuña digerido, frente a un testigo de la misma cantidad de polvo de

282153



pezuña incubado en las mismas condiciones con 5 ml de un caldo análogo que no había sido inoculado de "Streptomyces fradiae".

El resultado del ensayo demostró que el 50% del volumen aparente de la queratina había sido digerido por el enzima obtenido y presente en el caldo fermentado activo.

E J E M P L O 2º.

Se realizan las mismas técnicas de manipulación descritas en el ejemplo 1º, empleando un medio igual al descrito en dicho ejemplo 1º para la primera fase de siembra.

Para la segunda fase de crecimiento se prepara el medio siguiente:

Medio de crecimiento.

	Harina de soja .....	30,000 grs.
15	Fosfato dipotásico .....	1,000 "
	Cloruro sódico .....	0,500 "
	Sulfato ferroso .....	0,010 "
	Cloruro cálcico .....	0,050 "
	Sulfato magnésico .....	0,050 "
20	Agua c.s.p. ....	1 litro

Con el que se opera según el ejemplo 1º.

El caldo de cultivo en el fermentador de 8 litros se prepara de acuerdo con la siguiente composición:

	Harina de soja .....	30,000 grs.
25	Fosfato dipotásico .....	1,500 "
	Sulfato magnésico .....	0,050 "
	Cloruro cálcico .....	0,050 "
	Sulfato ferroso .....	0,015 "
	Sulfato de zinc .....	0,005 "
30	Glucosa .....	30,000 "
	Carbonato cálcico .....	10,000 "

282153



pH después de esterilizar ..... 7,0-8,0

La preparación del fermentador de 8 litros y la fermentación transcurren igual que en el ejemplo 1º.

El caldo fermentado filtrado, que mostró análoga actividad queratolítica valorado según se ha dicho en el ejemplo 1º, se adicionó de dos volúmenes de acetona anhidra, añadida lentamente y con agitación constante al caldo, que previamente había sido adicionado de 20 gr. de supercel por litro de caldo, para precipitar el producto activo,

Terminada la adición de la acetona, se dejó reposar en frío, se decantó la porción acetona-agua sobrenadante, y finalmente se filtró la porción remanente, quedando retenido el enzima-supercel sobre el filtro.

La torta filtrada y agotada a vacío se desecó a temperatura ambiente resultando, después de la molturación, un polvo suelto y cómodamente manipulable de color pardo, con un rendimiento de 32,6 gramos de producto sólido por litro de caldo.

Para demostrar la actividad queratinolítica del producto, el polvo seco se suspendió en el mismo volumen del caldo original de un buffer de fosfatos 0,02 M a pH = 8,3. Se agita durante 15 minutos para asegurar la disolución del enzima activo y se filtra para eliminar el supercel, que queda en el filtro.

El líquido filtrado se valora en su actividad queratinolítica igualmente que se valoró el caldo filtrado, dando una capacidad digestora de queratina del 85% de la del caldo original.

E J E M P L O 3º.

Medio de siembra: Igual al del ejemplo 1º.

Medio de crecimiento: Igual al del ejemplo 2º pero

282153



sustituyendo la harina de soja por:

Harina de escamas de pescado ..... 30,000 grs.

Medio de cultivo: Igual al del ejemplo 2º, sustituyendo la harina de soja por:

5 Harina de escamas de pescado ..... 30,000 grs.

Métodos operatorios: Se procede a lo largo de toda la manipulación de la misma forma que en el ejemplo 1º y con una porción del caldo filtrado, se obtiene por precipitación el producto sólido activo, como se indica en el ejemplo 10 2º.

Valoración de la actividad: Se procede con los caldos filtrados para su valoración de la misma forma que se indica en el ejemplo 1º y una porción de los caldos precipitados al estado sólido se valora la actividad queratolítica según se indica en el ejemplo 2º.

E J E M P L O 4º.

Medio de siembra: Idéntico al del ejemplo 2º.

Medio de crecimiento: Idéntico al del ejemplo 2º, pero sustituyendo la expresada cantidad de harina de soja por igual cantidad de harina de altramuces.

Medio de cultivo: Igual al descrito en el ejemplo 2º pero sustituyendo la cantidad expresada de harina de soja por igual cantidad de harina de altramuces.

Métodos operatorios y valoración de la actividad:  
25 Idénticos a los del ejemplo 1º.

E J E M P L O 5º

Medio de siembra: Idéntico al del ejemplo 2º.

Medio de crecimiento: Idéntico al del ejemplo 2º, pero sustituyendo la expresada cantidad de harina de soja por igual cantidad de levadura de cerveza íntegra desecada.

Medio de cultivo: Igual al descrito en el ejemplo 2º pero sustituyendo la cantidad expresada de harina de soja por igual cantidad de levadura de cerveza íntegra desecada.

282153



Métodos operatorios y valoración de la actividad:

Idénticos a los del ejemplo 1º.

E J E M P L O 6º

Idéntico en cuanto a métodos operatorios y composición de los medios al ejemplo 5º precedente, sustituyendo en el Medio de Cultivo el 50% de la glucosa por almidón de maiz.

La fermentación en este caso transcurre en los mismos términos aproximadamente, que en el ejemplo precedente sin más diferencias que la elevación de pH es más lenta y la duración del proceso de fermentación es mayor (unas 24-28 horas más).

Aunque en los ejemplos anteriores no se describe en cada caso la separación del producto sólido y solo se incluye en el ejemplo 2º en forma de precipitación acetónica directa del caldo fermentado es común a todos los ejemplos descritos que una vez terminada la fermentación, pueden separarse los caldos de cultivo, ya con actividad proteolítica y concretamente queratolítica, por filtración o centrifugación y emplearse directamente en los diversos usos a que se destinen. Pero también pueden separarse los enzimas activos por las técnicas ordinarias conocidas. Es decir:

Por precipitación mediante adición al medio acuoso del caldo, de disolventes hidrosolubles (alcohol, acetona, etc.), de tal forma que se llegue a una concentración en que el enzima sea insoluble y cuidándose de hacer la adición de manera que el enzima no resulte desnaturalizado; por salado ("salting-out"), con las precauciones técnicas habituales; por desecación, que puede hacerse, bien directamente del caldo, bien de sus concentrados, y a temperatura suficientemente baja para que el producto activo no resulte inactivado durante el proceso de desecación (evaporación, liofilización, etc.).

Cualesquiera de los anteriores procedimientos, conocidos por la química preparativa, que conducen a la obtención



de productos sólidos pueden completarse con fases intermedias:

5. 1ª) De concentración a pH y temperaturas tales que, jugando con los dos factores, no resulte inactivado el enzima (ordinariamente, entre 6 y 8,5 de pH y temperatura inferior a 70°C).

10. 2ª) De adición de soportes sólidos inertes, que pueden ser, por ejemplo, arena neutra; tierra de infusorios, aserrín, etc., en los que el sólido obtenido se deposite recubriendo la superficie del soporte inerte, cuando por cualesquiera de los procedimientos de separación a sólido sea el producto activo separado al estado sólido, con lo que se facilitará la desecación y manipulación del producto sólido obtenido; con este mismo objeto pueden adicionarse compuestos químicos (por ejemplo: sal común, fosfatos neutros, etc.) que se separen conjuntamente con los enzimas activos en el proceso de precipitación y sirvan de soportes a aquellos.

15. Es claro que a los caldos o a los sólidos obtenidos de ellos, pueden añadirse los correctores, conservadores tamponantes, activadores de la acción enzimática, etc., para su empleo conjunto según los fines a que los enzimas se dediquen en cada caso.

#### NOTA

20. Descrito suficientemente el objeto de la patente de invención que se solicita, se declara que lo que constituye la esencia del mismo, nuevo y no conocido (en España), es lo que se concreta en las siguientes reivindicaciones:

25. 1ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, caracterizado por que se provoca una fermentación biológica mediante la inoculación de microorganismos del género "Streptomyces" en medios de cultivo proteicos exentos de queratina o no queratinosos.

30. 2ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos



ticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según la reivindicación anterior, caracterizado, además, por que como microorganismo del género "Streptomyces" se emplea el "Streptomyces fradiae".

5.                   3ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por que el microorganismo crece y se cultiva en caldos cuyo aporte proteico consiste en productos naturales vegetales o animales, ricos en
10.                   proteínas completas no queratínicas, con toda la secuencia de aminoácidos esenciales, incluyendo los cíclicos.
- 4ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, por que los aportes
15.                   proteicos naturales no queratinosos pueden ser harinas o hidrolizados, en mayor o menor grado de hidrólisis, de alfalfa, altramuz, escamas de pescado y levadura de cerveza.
- 5ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por que los medios de cultivo proteicos no queratinosos pueden ser adicionales o no de hidratos de carbono y sales minerales, ajenos a los naturalmente presentes en el aporte proteico natural.
20.                   6ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por que, provocados los pasos sucesivos de crecimiento del microorganismo hacia mayor volumen, el medio de cultivo se incula con la suspensión acuosa del inóculo del último estadio, conduciendo la fermentación entre 25º y 36º, con agitación de entre 100 y 800 revoluciones por minuto, y aireando por medio con aire estéril a razón de entre 0,5 y 2,00 litros de aire por litro de líquido y
- 25.
- 30.



minuto, hasta que los valores de pH lleguen aproximadamente a 8,0-8,8.

5. 7ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado además por que los caldos resultantes de la fermentación se pueden purificar o concentrar por desproteínización, salificación, ("salting-out") evaporación o concentración en vacío.
10. 8ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además por la posibilidad de utilización directa de la actividad enzimática queratinolítica del caldo de fermentación, con o sin la purificación o concentración complementaria a que se refiere la reivindicación anterior.
15. 9ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica, según las siete primeras reivindicaciones, caracterizado, además, por que de los caldos resultantes de la fermentación se puede separar la fracción enzimática activa en estado sólido, por salificación ("salting-out"), insolubilización por adición de disolventes orgánicos hidromiscibles o liofilización con o sin adición de soportes inertes adecuados.
20. 10ª) Procedimiento de obtención de productos proteolíticos enzimáticos con actividad queratinolítica.
- 25.

Todo según queda descrito y reivindicado en la presente Memoria que consta de catorce hojas foliadas y escritas a máquina por una de sus caras.

Madrid, 2 de Noviembre de 1.962.

EL AGENTE,  
p.p.