

P.- 43.785

375480

42205

SECCION TECNICA

CLASIFICACION

CLAS. A61

SUBCLAS. K



Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S

entidad / de nacionalidad danesa

con domicilio en Fuglebakkevej 115, Copenhague, Dinamarca

por: "UN PROCEDIMIENTO EN LA PRODUCCION DE COMPOSICIONES
DEPILADORAS"

(Clase Internacional A61k)

3.2.70.



El presente invento se refiere a un procedimiento en la producción de composiciones depiladoras.

5 En el antiguo procedimiento de depilado se colocaban los cueros en un baño que contenía hidróxido de calcio y sulfuro de sodio y que tenía un valor de pH de aproximadamente 12. Este procedimiento de depilado es perjudicial para el pelo que pudiera ser de valor comercial.

10 Durante los últimos años se ha hecho uso de composiciones depiladoras que contienen enzimas proteolíticas, y el depilado se ha llevado a cabo a un valor de pH más bajo comprendido entre 7 y 10, lo cual no afecta al pelo. Por otra parte no se obtiene hinchamiento del material de las pieles o cueros como ocurría en el antiguo procedimiento de depilado, lo que provoca dificultades en el ulterior tratamiento de las pieles o cueros.

15 El procedimiento de acuerdo con el invento se caracteriza principalmente por incorporar en composiciones depiladoras una o más enzimas proteolíticas que muestren actividad proteolítica óptima contra la hemoglobina en presencia de urea a un valor de pH superior a 9.

Estas enzimas proteolíticas son desconocidas hasta ahora y su presencia en las composiciones depiladoras constituye una mejora material de la técnica.

25 Durante su metabolismo, un gran número de bacterias hasta ahora desconocidas forman enzimas proteolíticas que pueden ser usadas en el procedimiento del invento.

30 A partir de muestras de tierra, estiércol o abono animal y cierto número de otras fuentes naturales los inventores han aislado alrededor de un ciento de cepas o géneros de bacterias, han llevado a cabo investiga-

3.2.70.



ciones taxonómicas y han encontrado que todas las bacterias hasta ahora desconocidas pertenecen al género Bacillus, pero que ninguna de ellas pertenece a ninguna especie conocida para los inventores, y que, hasta donde llegan los conocimientos de los inventores, no pertenecen a las mismas especies. Además, dentro de las mismas especies había en la mayoría de los casos diferentes géneros y diversas variedades.

Con el fin de aislar las bacterias hasta ahora desconocidas referidas anteriormente, se ha hecho uso de una nueva técnica.

Muestras de tierra, estiércol animal u otras fuentes naturales han sido diseminadas sobre medios nutritivos que tienen un valor de pH elevado (9 a 11) y las bacterias capaces de crecer bajo tales condiciones alcalinas son luego aisladas y sometidas a posteriores investigaciones como a producción de especies y enzimas.

En la mayoría de los casos, se ha hecho uso también de cierto número de diferentes métodos de enriquecimiento.

Métodos de enriquecimiento son conocidos en la técnica. Se puede hacer referencia a Hayaishi, Methods in Enzymology, Vol. 1, 126-131. Un principio consiste en dejar una muestra de cultivo natural sobre un medio nutritivo que tiene una composición específica y elegida que favorece el crecimiento de un microorganismo que da productos metabólicos que tienen las propiedades ya deseadas. Otro principio consiste en guardar la muestra natural juntamente con un compuesto, tal como una sal inorgánica, favoreciendo el desarrollo del deseado microorganismo, cfr.

30
3.2.70.

Tabla I

Nº de refe.	Número de NCIB	Fuente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:
C 300	10144	Tierra de cementerio de Copenhague	Medio de caseína - almidón (pH elevado escalonadamente de 10 a 12)
C 301	10145	Tierra de cementerio de Copenhague	Diseminación de muestras de tierra sobre agar con sesquicarbonato (pH = 9,6 - 9,8). Pruebas de zonas de hidrólisis sobre agar neutro con lecho desnatada.
C 302	10146	Tierra de la orilla del río de Copenhague	
C 303	10147	Montón de hojas y tierra del cementerio de Copenhague	
C 304	10148	Arena de madera de Blokhuis, Jutlandia	
C 311	10281	Tierra de madera de Ascheberg, Holstein	
C 323	10282	Tierra de campiña de ciudad danesa	Agar de perborato
C 325	10284	Infeción sobre placa con orificios con perborato.	Agar de perborato
C 334	10286	Tierra de orilla de río de ciudad danesa	Agar de perborato
C 335	10287	Tierra de jardín de ciudad danesa	Agar de perborato
C 336	10288	Estiércol de caballo y elefante	Agar de perborato

10 ABR 1970



3.2.70.

Tabla I (Continuación)

Nº de refe.	Número de NCIB	Fuente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:
C 339	10291	Tierra de orilla de río de ciudad danesa	Agar de perborato
C 341	10293	Tierra de campiña de ciudad danesa	Agar de perborato
C 351	10301	Estiércol de pollos	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH de 8,8 a 9,7)
C 352	10302	Estiércol de avestruz de Zoo	Enriquecimiento con sesquicarbonato sódico (pH 9,2 - 9,6)
C 354	10304	Basura de corral de pollos	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 40°C.
C 356	10306	Corteza de jardín	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 50°C.
C 357	10307	Basura de corral de pollos	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 50°C.
C 358	10308	Basura de corral de pollos	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 50°C.
C 360	10309	Basura de jardín de ciudad danesa	Agar de perborato
C 364	10310	Raspaduras de cisternas de W.c.	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH: 8,8 - 9,7)

375 480



Tabla I (Continuación)

Nº de refe.	Número de NCIB	Fuente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:
C 365	10311	Líquido de baño de limo de tenería	Enriquecimiento con salvadososa.
C 366	10312	Heces de bebés	Enriquecimiento con almidón (pH 11) con nitrógeno inorgánico.
C 367	10313	Estiércol de elefante	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH 8,8 - 9,7)
C 369	10314	Estiércol de avestruz de Zoo	Proteosa peptona (botellas de agitación) pH 9,7.
C 370	10315	Raspaduras de depósitos de baños de limo de tenería	Enriquecimiento con manitol-NO ₃ K alcalino.
C 371	10316	Estiércol de elefante	Proteosa peptona (botellas de agitación) pH 9,7.
C 372	10317	Arcilla de campiña de césped de Ascheberg, Holstein	Enriquecimiento con detergente de caseína de almidón.
C 373	10318	Basura de jardín de ciudad danesa	Agar de perborato.
C 374	10319	Arcilla de campiña de césped de Ascheberg, Holstein	Enriquecimiento con caseína de almidón sal sódica del ácido etilendiamintetraacético.
C 375	10320	Estiércol de avestruz de Zoo	Enriquecimiento con sesquicarbonato sódico (pH: 9,2-9,6).
C 376	10321	Estiércol de elefante	Enriquecimiento con sesquicarbonato sódico (pH: 9,2-9,6).



Tabla I (Continuación)

Nº de refe.	Número de NCIB	Fuente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:
C 377	10322	Agua de estanque de hipopótamo	Enriquecimiento con almidón de caseína termofílica con NaOH.
C 378	10323	Raspadura de depósitos de baños de limo de tenería.	Enriquecimiento con manitol-NO ₃ K.
C 410	10324	Estiércol de tigre)Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH: 8,8) - 9,7).
C 411	10325	Estiércol de paloma	
C 412	10326	Basura de corral de pollos de ciudad danesa	Almacenamiento sobre harina de patata y sesquicarbonato sódico.
C 413	10327	Arcilla de campiña de césped de Ascheberg, Holstein.	Enriquecimiento con almidón (pH 11) con nitrógeno inorgánico.

375 480





Las investigaciones taxonómicas de todos estos miembros del género *Bacillus* han sido llevadas a cabo utilizando los métodos descritos por Smith, Gordon & Clark en "Aerobic Spore-forming Bacteria", U.S. Department of Agr., Monograph No. 16 (1952). Estos métodos están considerados aún ahora como unos de los más satisfactorios, pero hubieron de ser modificados en vista del hecho de que todos los medios nutrientes tenían que ser ajustados sobre unos valores de pH mucho más altos que los indicados por Smith, Gordon & Clark porque todas las especies de *Bacillus* enumeradas en la Tabla I crecen a valores de pH elevados.

Las bacterias pueden ser divididas bastante correctamente en grupos morfológicos. Estos grupos difieren unos de otros en una magnitud tal que actualmente representan especies separadas.

Entre los grupos morfológicos se han encontrado variaciones en las reacciones bioquímicas. Sobre las bases de estas variaciones los grupos se han subdividido en variedades que son representadas por uno o más géneros.

Las investigaciones taxonómicas se describen con detalle en la memoria de la patente española número 358.722.

Sobre las bases de las investigaciones taxonómicas de los inventores los miembros del género *Bacillus* recopilados en la Tabla I serían clasificados como aparece en la tabla II siguiente.



Tabla II

Especies	Variedad	Cepas
I	a	C 300, C 301, C 360 C 372, C 374
	b	C 302, C 334
	c	C 323, C 339, C 352, C 369
	d	C 303, C 311, C 336
II		C 335, C 341
IV	a	C 303, C 354, C 357, C 366, C 367, C 371, C 375, C 378
	b	C 351, C 356, C 364, C 376, C 377, C 411
	c	C 358, C 410
V		C 365, C 412
VI	a	C 373
	b	C 325, C 413
VII		C 370

Las enzimas proteolíticas a utilizar en el procedimiento según el invento pueden producirse por cultivo aerobio de cualquiera de las especies y cepas de las tablas I y II. El cultivo se lleva a cabo de acuerdo con los principios conocidos en la técnica, salvo que durante el cultivo el medio nutriente que contiene fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, se mantiene a un valor de pH superior al utilizado hasta ahora, preferiblemente

5

8

1.4.70.

375480



571

dentro del margen de 7,5 a 10,5. Los rendimientos obtenidos se determinan por el bien conocido método de la hemoglobina de Anson, cfr. Journal of General Physiology, 22, 79-89 (1959). Una unidad de Anson significa durante toda esta memoria la cantidad de enzima proteolítica que digiere hemoglobina a un valor de pH de 10,1 y a una temperatura de 25°C. durante un tiempo de reacción de 10 minutos con una velocidad inicial tal que por minuto hay formada una cantidad tal de productos divididos que no puede ser precipitada con ácido tricloroacético que estos productos divididos dan el mismo color con reactivo de fenol como lo hace un miliequivalente de tirosina.

El medio nutriente está compuesto en conformidad con los principios del arte conocidos. Fuentes convenientes de carbón asimilables son hidratos de carbono, tales como sacarosa, glucosa, almidón, harina de granos cereales, malta, arroz, sorgo, etc. La concentración de carbohidratos puede variar entre límites bastante grandes, por ejemplo, por encima del 25% y por debajo del 1 - 5 %, pero generalmente sería adecuado del 8 - 10%, estando calculado el porcentaje como dextrosa. Se ha encontrado que la presencia en el medio nutriente de carbohidratos dará lugar a la formación de componentes acídicos, resultando un decrecimiento del valor de pH durante el cultivo. Como es esencial mantener el valor del pH del medio nutriente entre el orden de 7 a 12 durante el cultivo, deben ser tomadas medidas que no dejen caer el valor del pH por debajo de 7 en un período esencial durante el cultivo. A fin de mantener el valor de pH entre el margen requerido, puede ser usada una cantidad limitada de carbohidratos junta

30
3.2.70.

375 480



mente con una sustancia reguladora que sea capaz de mantener el requerido valor de pH. Se ha encontrado que carbonatos, particularmente sesquicarbonatos, utilizados en una concentración de hasta 0,2 M en el medio, es capaz de crear un valor de pH de aproximadamente 10,5 y 9,3, respectivamente.

También pueden utilizarse otros sistemas reguladores o tamponadores, tales como reguladores de fosfato.

Es también posible iniciar el cultivo con un bajo contenido de carbohidratos y añadir pequeñas cantidades de carbohidratos sucesivamente durante el cultivo.

Una tercera posibilidad es hacer uso del control de pH automático por adición de varias sustancias de reacción básica utilizadas en esta técnica.

El uso de carbonatos y sesquicarbonatos como sustancias controladoras de pH es muy útil y es sorprendente que es posible durante el cultivo utilizar estos compuestos en las concentraciones ya referidas.

La fuente de nitrógeno en el medio nutriente puede ser de naturaleza inorgánica y/u orgánica. Fuentes inorgánicas de nitrógeno adecuadas son algunos nitratos y sales de amonio, y entre las fuentes de nitrógeno orgánicas hay todo un número conocido para uso en procedimientos de fermentación y en los cultivos de bacterias. Ejemplos que ilustran son harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de cacahuet, caseína, licor de maceración de maíz, extractos de levaduras, urea, albúmina, etc.

Además, el medio nutriente contendría naturalmente las sustancias traza habituales.

30
3.2.70.



13 J

La temperatura a la que tiene lugar el cultivo está normalmente en el mismo margen que la del cultivo conocido de las especies conocidas del género Bacillus. Generalmente es conveniente una temperatura entre 25 y 55°C. La temperatura es preferiblemente 30 a 40°C.

Como los cultivos se han de llevar a cabo bajo condiciones aerobias, es decir, cuando se usan tanques de fermentación, se hace necesario el uso de aireación artificial. La cantidad de aire es semejante a la que se usa en procedimientos de cultivo conocidos.

En general los rendimientos máximos de enzimas proteolíticas serán obtenidos después de un tiempo de cultivo de 1 a 5 días.

Ejemplos ilustrativos de medios de cultivo adecuados son:

1) Medio BPPA con la siguiente composición:

	Harina de patata	50 g	por	litro	de	agua	corriente
	Sacarosa	50 g	"	"	"	"	"
	Harina de cebada	50 g	"	"	"	"	"
20	Harina de soja	20 g	"	"	"	"	"
	Caseinato sódico	10 g	"	"	"	"	"
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9 g	"	"	"	"	"
	Pluronic	0,1 g	"	"	"	"	"

2) Medio BSX con la siguiente composición:

25	Harina de cebada	100 g	por	litro	de	agua	corriente
	Harina de soja	30 g	"	"	"	"	"
	Pluronic	0,1 g	"	"	"	"	"

Ambos medios son ajustados al valor de pH deseado por adición de sesquicarbonato o sosa bajo condiciones estériles. El almidón contenido en los medios fue licuado por medio de alfa-amilasa antes de la esterilización.

2.7.71.



Los dos medios de cultivo BPPA y BSX, cuando se usan para cultivo en tanques de acero inoxidable de 550 litros bajo condiciones sumergidas y aireación artificial, darán los resultados compilados en la siguiente Tabla III que da también información de los géneros utilizados y de las condiciones de cultivo.

Tabla III

Cepas	C 335	C 339	C 351
Medio	BPPA	BPPA	BSX
Valor de pH antes de la inoculación	10,2	10,5	10,2
Temperatura de cultivo en grados Celsius	34	34	34
Aire, m ³ por minuto	0,25	0,25	0,3
Tiempo de cultivo en horas	84	97	83
Valor de pH final	9,2	9,1	9,35
Actividad proteolítica final expresada en unidades Anson por kg de substrato	40	29	33

Con el género C 303 en cuatro series bajo diferentes condiciones se obtienen los resultados compilados en la siguiente Tabla IV.

3.2.70.

375480



10 AB

Tabla IV

Cultivo nº.	1	2	3	4
Harina de cebada g/litro	100	100	150	200
Harina de soja g/litro	30	30	45	60
Pluronic ml/litro	0,03	0,03	0,03	0,03
Na ₂ CO ₃ (adición es- téril antes de la inoculación)	0,2 M	0,2 M	0,2 M	0,4 M
pH antes de la inoculación	10,1	10,1	10,35	10,1
Temperatura de cultivo °C	34	34	34	34
Aire m ³ /minuto	0,3	0,3	0,3	0,3
Tiempo de culti- vo en horas	125	104	113	126
pH máximo	9,3	9,3	9,6	9,3
Máximo de unida- des Anson por kg	67	80	77	66

Las enzimas proteolíticas pueden ser recupera-
das a partir del caldo de cultivo por centrifugación, pre-
cipitando la enzima a partir del líquido así obtenido por
adición de Na₂SO₄ o etanol, separando el precipitado del
5 líquido por filtración con kieselgur como auxiliar de fil-
tración y secando el precipitado para formar un polvo que
contiene las enzimas proteolíticas activas.

En la memoria de la Patente española nº.
358.722 se encuentra más información detallada sobre la
producción y separación de las enzimas proteolíticas a

10
1.4.70.



utilizar en el procedimiento del presente invento.

Pruebas de las enzimas proteolíticas obtenidas por los géneros enumerados en la Tabla II han mostrado que hay diferencias materiales entre las encimas con respecto a sus propiedades.

5

Con respecto a la actividad proteolítica parece que las enzimas pueden dividirse en dos grupos o tipos cuando la actividad proteolítica se mide a pH 12 por el método de Anson y se expresa en porcentaje de actividad máxima, a saber:

10

Tipo 1: 100 a 80 %

Tipo 2: 80 a 50 %

En el procedimiento del presente invento se prefiere incorporar en las composiciones depiladoras una o más de las enzimas proteolíticas de tipo 1, pero también pueden utilizarse las enzimas de tipo 2.

15

Es sabido en la técnica que los iones calcio estabilizan la actividad de la mayoría de las enzimas proteolíticas. Las nuevas enzimas producidas por las bacterias enumeradas en la Tabla I y divididas en especies y variedades en la Tabla II han sido probadas con respecto a los efectos estabilizadores de los iones calcio en una concentración de 0,01M a pH 10,5 u 11, y la estabilización ha sido señalada en porcentaje de actividad residual después de dejar estar 30 minutos a 50°C. Los resultados de los tipos de enzima probados y el efecto de estabilización de los iones calcio son recopilados en la Tabla V en la que "mas" da a entender que la actividad proteolítica residual en ausencia de iones calcio está por debajo del 80 % de la correspondiente actividad del control en presen

20

25

30
3.2.70.



cia de iones calcio, y "menos" significa que la actividad proteolítica residual en ausencia de iones calcio está por encima del 80% de la actividad correspondiente del control en presencia de iones calcio.

5

Tabla V

10

15

20

Especies	Var.	Cepas	Tipo de enzima	Estabilización CA ⁺⁺
I	a	C 300, C 301, C 360, C 372, C 374	1	++++
	b	C 302, C 334	1	++
	c	C 323, C 339, C 352, C 369	2	?+++
	d	C 304, C 311, C 336	1	+++
II		C 335, C 341	2	++
IV	a	C 303, C 354, C 357,)) C 366, C 367, C 371,)) C 375, C 378)	1	-----?
	b	C 351, C 356, C 364,)) C 376, C 377, C 411	1	-?----+
	c	C 358, C 410	1	-+
V		C 365, C 412	1	-?
VI	a	C 373	1	-
	b	C 325, C 413	1	??
VII		C 370	1	-

25

La actividad proteolítica de las enzimas producidas por las cepas enumeradas en la Tabla V ha sido probada no solamente a pH 12, sino también a valores de pH inferiores para dar una impresión más detallada de la actividad proteolítica a diferentes valores de pH y más información de la actividad de los tres tipos de enzimas.

30
1.4.70.

10 ABR 1970

Con propósito de ilustración se hace referencia a los dibujos en los que

5 Fig. 1 muestra la actividad proteolítica de la enzima producida por la cepa C 311, perteneciendo dicha enzima al tipo 1, y

Fig. 2 muestra de la misma manera la actividad de la enzima producida por la cepa C 335, perteneciendo dicha enzima al tipo 2.

10 Debería entenderse que el propósito de mostrar las curvas de actividad en los dibujos es para ilustrar en principio la diferencia de actividad de los tres tipos de enzimas proteolíticos al variar los valores de pH y que la curva de actividad para cada tipo puede variar algo sin pérdida de su apariencia característica. En estas curvas se ha llevado sobre el eje de abscisas el pH y sobre el de ordenadas, la actividad en porcentajes.

15 La utilidad de las enzimas para su incorporación en composiciones depiladoras se desprenderá de las siguientes pruebas:

20 a) Estabilidad contra surfactantes o agentes tensoactivos.

25 La estabilidad de soluciones que contienen la enzima y diferentes surfactantes fue determinada utilizando tres surfactantes típicos en concentraciones correspondientes a las empleadas en la solución de lavado:

- 1. Jabón 0,25 g por litro
- 2. DBS -un alcohol-aril-sulfonato (50%) 2,5 g por litro
- 3. TAS sulfato de alcohol de sebo (25%) 5,0 g por litro

30
1.4.70.

375480



La concentración de enzima fue 0,1 unidad Anson por litro. Las condiciones de prueba fueron 30 minutos a 50°C a pH 10, y el método de análisis fue el método de la nitro-caseína, cfr. E.v. Pechmann, Biochemische Zeitschrift, Bd. 321, 248-260 (1950).

Los resultados se compilan en la Tabla VI, en la que las cifras han de entenderse como sigue:

Las cifras situadas antes de la barra muestran el porcentaje de la actividad residual, cuando se realiza el análisis inmediatamente después de la adición del surfactante, es decir, estas cifras dan una indicación del grado inicial de inactivación.

Las cifras situadas después de la barra indican la diferencia entre esta actividad residual inicial y el porcentaje de actividad residual después de 30 minutos.

b) Tipo de enzima

Se ha encontrado que todas las preparaciones de enzimas son inhibidas momentáneamente y completamente por el fluoruro de fenilmetilsulfonilo, lo cual significa que todas las enzimas tienen serina en el centro activo.

c) Estabilidad de pH

En conexión con las cinco preparaciones de enzima ha sido determinada la estabilidad a diferentes valores de pH bajo las siguientes condiciones:

Duración: 24 horas a 25 °C

Valores de pH 5 - 7 - 8 - 10 - 12

Concentración de enzima 0,2 unidades Anson por litro.

30
3.2.70.

En la Tabla VI se indica el margen de pH den-



tro del cual se hubo encontrado una actividad residual de 80 a 100%.

5 Pruebas de las preparaciones de enzimas producidas por la cepa C 303 contra sulfito sódico han demostrado que la enzima no es sensible a este agente reductor, lo cual puede indicar que los puentes S-S no son esenciales para la estructura terciaria de la enzima.

1.4.70.

375480

Tabla VI

Cepa	Preparación de enzima en forma de polvo. g.	Actividad unidades de Anson por g a pH	Tipo de enzima	Estabilidad surfactantes			Seri- na	pH de es- tabilidad
				Jabón		TAS		
				DBS	DBS	TAS		
C 300	2	0,5 (10)	1	82/71	56/48	7/6	+	6,0 - 10,5
C 301	2	0,7 (10)	1	50/47	35/31	4/2	+	
C 302	3	0,7 (10)	1	59/56	60/-	3/1	+	
C 303	600	3,0 (7,5)	1	85/50	40/30	23/18	+	
C 304	2,5	0,3 (7,5)	1	57/56	34/31	3/0	+	
C 334	1500	0,5 (7,5)	1	100/83	90/27	93/73	+	
C 351	9	1,3 (7,5)	1	93/67	67/50	53/45	+	
C 354	42	0,6 (7,5)	1	77/33	60/38	60/53	+	
C 360	117	0,4 (7,5)	1	97/94	76/70	75/75	+	
C 364	456	0,9 (7,5)	1	81/31	27/11	16/8	+	
C 365	2000	0,4 (7,5)	1	100/0	72/30	92/48	+	
C 366	26	0,8 (7,5)	1	92/42	67/14	68/61	+	
C 367	500	2,2 (7,5)	1	88/2	58/34	71/52	+	
C 370	3000	0,6 (7,5)	1	94/4	33/15	67/30	+	
C 371	50	1,0 (7,5)	1	97/60	70/44	93/57	+	
C 372	430	2,7 (7,5)	1	98/95	75/68	87/85	+	
C 376	17	7,8 (7,5)	1	66/42	25/10	15/12	+	
C 377	213	1,9 (7,5)	1	100/10	59/27	74/59	+	
C 335	1500	0,3 (7,5)	2	95/51	40/32	78/71	+	
C 339	217	1,4 (7,5)	2	89/10	75/57	83/62	+	
C 369	7,2	1,4 (7,5)	2	28/28	6/6	0/0	+	



A partir de la Tabla VI se verá que cierto número de preparaciones de enzimas muestran propiedades de estabilidad asombrosas.

5 En general, las enzimas proteolíticas se incorporan en las composiciones depiladoras en forma de una mezcla sólida o líquida de las enzimas proteolíticas y otros componentes que actúan como vehículos. Cuando las preparaciones o composiciones de enzimas están en forma sólida, pueden consistir en gránulos en los que están incorporadas las enzimas, por ejemplo juntamente con otras 10 enzimas o sustancias que tienen otra actividad que la enzimática útiles para la utilidad de las composiciones depiladoras. Cuando las enzimas no son utilizadas en forma cristalina, pueden ir acompañadas por impurezas de naturaleza orgánica, tales como proteínas y carbohidratos del 15 medio de cultivo.

Las composiciones enzimáticas en forma líquida pueden consistir en soluciones o suspensiones que contienen, si es necesario, agentes estabilizadores.

20 Generalmente las nuevas enzimas del invento se incorporan en pequeñas cantidades. En vista de ello las preparaciones o composiciones de enzimas normalmente muestran un contenido en enzima que no excede de alrededor de 10% en peso.

25 Los siguientes experimentos ilustran el efecto de incorporar algunas de las nuevas enzimas proteolíticas en composiciones depiladoras.

Ejemplo 1

30 Un cuero de vaca salado (el extremo) es cortado en trozos que miden aproximadamente 20 x 4 cm. Los trozos son macerados 24 horas y son separadas por raspado la 22.6.70.

375480



grasa y la carne. Las piezas de cuero son entonces colocadas en 400 ml de soluciones de enzima diferentes contenidas en vasos de 500 ml de capacidad. Los vasos son incubados a 30°C durante 24 horas. Los trozos son entonces sacados de las soluciones y los pelos son raspados con un trozo de plexiglas. El efecto depilante es valorado de acuerdo con la siguiente escala:

1. Facilidad y completa separación de los pelos.
2. Facilidad de separación de los pelos, pero permanecen ronchas de pelo en el cuero.
3. Ninguna o difícil separación de los pelos.

Las soluciones de enzima proteolíticas usadas contienen 1 g de hidróxido cálcico por 130 g de agua. La cantidad de enzimas se manifiesta en la Tabla inferior VII, que también indica los valores de pH al principio y al final del procedimiento de depilado juntamente con los resultados del mismo.

3.2.70.

Tabla VII

No.	1	2	3	4
Enzima de la cepa	control	0 303	0 367	0 372
Cantidad de enzima unidades Anson	0	0,5 5	0,5 5	0,5 5
Valor inicial de pH	11,9	11,9 11,9	11,9 11,8	12,0 11,9
Valor final de pH	11,9	11,8 11,8	11,8 11,8	11,9 11,8
Resultado de depilación	3	1 1	2 2	3 1



375480



Ejemplos 2 a 4

Se dejaron en reposo piezas de piel de vaca de 10 cm x 10 cm a la temperatura ambiente sin agitación alguna en solución saturada de cal que contenía diversas cantidades de la enzima. A intervalos adecuados se efectuaron estimaciones del grado de desprendimiento del pelo, utilizando una técnica de rascador simple y una evaluación de acuerdo con una escala arbitraria como sigue:

1. Desprendimiento completo
2. Se mantiene con alguna fuerza en ciertos sitios
3. Ligero desprendimiento
4. No se produce desprendimiento alguno.

Las condiciones del experimento fueron:

Temperatura: Entre 16 y 25°C (fluctuación normal día-noche).

pH: La solución saturada de cal dio inicialmente un valor de pH de 12,3, el cual descendió durante el transcurso del experimento a 11,7.

Tiempo: Las evaluaciones se hicieron a intervalos de 24 horas y el desprendimiento fue completo dentro del período de 48-65 horas. Los experimentos se interrumpieron a las 65 horas.

Duplicación: Todos los experimentos se efectuaron por duplicado.

Bactericida añadido: En los ejemplos 2 a 4 se añadió como bactericida 0,002% de sal sódica del ácido etil-mercurio-sulfuro-benzoico.

Concentraciones de Enzima: 0,02%, 0,1% y 1,0% peso/volumen, dando el intervalo de número total de unidades Anson en las soluciones como sigue:

30
22.6.70.



ALCALASE	0,27-13,56
Enzima de la cepa C 303	0,26 - 12,96
Enzima de la cepa C 367	0,42-20,80
Enzima de la cepa C 372	0,28-13,92

20 JUL

5 ALCALASE es la marca comercial y el nombre comercial para una enzima proteolítica producida por cultivo de cepas de Bacillus subtilis.

Ejemplo 2

10	Piel de Vaca: JERSEY	Evaluación del Desprendimiento del Pelo		
	Enzima	0,02%	0,1%	1,0%
	ALCALASE	3	3	3
	Enzima de la cepa C 303	2	1	1
	Enzima de la cepa C 367	1	1	1
15	Enzima de la cepa C 372	1	1	1
	Controles de cal	4		

Intervalo de unidades Anson/g de piel de vaca (x 10³):

	ALCALASE	1,9 - 96
	Enzima de la cepa C 303	1,8 - 81
20	Enzima de la cepa C 367	3,4-- 117
	Enzima de la cepa C 372	2,3-- 110

Ejemplo 3

Piel de Vaca: DANESA BLANCA Y NEGRA ("Danish Black and White")

25		Evaluación del Desprendimiento del Pelo		
	Enzima	0,02%	0,1%	1,0%
	ALCALASE	4	4	4
	Enzima de la Cepa C 303	3	2	1
	Enzima de la Cepa C 367	2	1	1
	Enzima de la Cepa C 372	2	1	1
	Controles de cal	4		

30
22.6.70.

375400



Intervalo de unidades Anson/g de piel de vaca (x 10³):

	ALCALASE	1,4 - 69
	Enzima de la Cepa C 303	1,5-- 74
	Enzima de la Cepa C 367	3,0 - 150
5	Enzima de la Cepa C 372	1,6 - 79

Ejemplo 4

Piel de Vaca: DANESA ROJA ("Danish Red")

Evaluación del Desprendimiento del Pelo

10	Enzima	0,02%	0,1%	1,0%
	ALCALASE	3	3	3
	Enzima de la Cepa C 303	3	2	1
	Enzima de la Cepa C 367	2	1	1
	Enzima de la Cepa C 372	3	2	1
15	Controles de cal	4		

Intervalo de unidades Anson/g de piel de vaca (x 10³):

	ALCALASE	2,3 - 120
	Enzima de la cepa C 303	1,6 - 80
	Enzima de la Cepa C 367	2,7 - 140
20	Enzima de la Cepa C 372	2,2 - 110

De los resultados se deducen con toda claridad dos puntos:

1. Las enzimas contenidas en los agentes de desprendimiento del pelo de acuerdo con la invención son esencialmente más estables que la proteasa alcalina (proteasa del tipo Bacillus subtilis) a los valores de pH realmente altos que se utilizan, es decir, de aproximadamente 12,3.

2. Las enzimas contenidas en los agentes de desprendimiento del pelo de acuerdo con la invención son

20 JUN



excelentes como agentes de desprendimiento del pelo para las pieles en combinación con el procedimiento de tratamiento con cal.

5 La relación líquido/piel es considerablemente más alta de la que se utilizaría en cualquier momento en la práctica, pero esto fue requerido por el tipo de equipo que se precisó utilizar en los ejemplos.

10 La caída de pH es mayor de lo que podría esperarse, y probablemente en la práctica el pH permanecería por encima de 12.

15 En una escala industrial se hará uso de control de la temperatura y agitación de la piel durante el tratamiento de desprendimiento del pelo, lo cual mejorará los resultados obtenidos en los experimentos arriba indicados.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

20

1.- Un procedimiento en la producción de composiciones depiladoras, caracterizado por incorporar en las composiciones una o más enzimas proteolíticas que muestran actividad proteolítica óptima contra la hemoglobina en presencia de urea a un valor de pH superior a 9.

24

22.6.70.

375480

20 JUN



5 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por incorporar una o más enzimas que muestran una actividad proteolítica que es de 80 a 100% de la actividad máxima cuando se mide por el método de Anson a un valor de pH de 12.

10 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por incorporar una o más enzimas que muestran una actividad proteolítica que es de 50 a 80% de la actividad máxima cuando se mide por el método de Anson a un valor de pH de 12.

15 4.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por incorporar una o más enzimas producidas por cultivo de especies del género Bacillus capaces de crecer y producir las enzimas a un valor de pH del medio nutriente dentro del margen de 9 a 11.

20 5.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por incorporar una o más enzimas producidas por cultivo de una o más de las especies I, II y IV a VII definidas en la memoria descriptiva.

25 6.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por incorporar una o más de las enzimas producidas por las bacterias recogidas en la Tabla I de la memoria descriptiva.

7.- Un procedimiento en la producción de composiciones depiladoras.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

50
22.6.70.

375480

20 JUN 70



Esta Memoria consta de treinta hojas escritas
a máquina por una sola cara.

Madrid, 20 JUN. 1970

P. A.

Alberto de la Haza
Por Poder

G.D.S.
22.6.70.

375480



375 480

Fig. 1

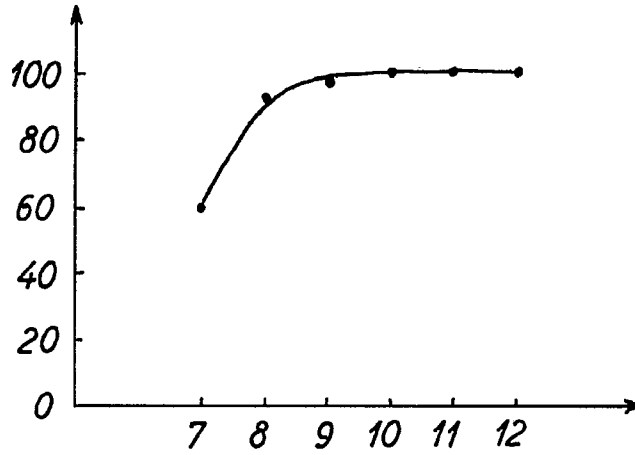
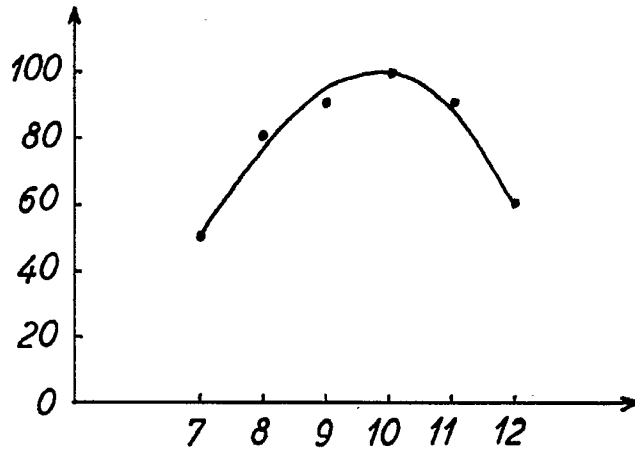


Fig. 2



Alberto Le...
For Poster