



437,478

4378

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de registro de una Patente de Invención por veinte años, en España, por "NUEVO - PROCEDIMIENTO DE CLARIFICACION DE LA TURBIDEZ ACTUAL O - POTENCIAL DE LIQUIDOS ACUOSOS", a favor del "INSTITUTO - DE FARMACOLOGIA ESPAÑOLA, S.L. (Fundación Marqués de Urquijo)", residente en Madrid, con domicilio en la calle de Alcalá, nº 95.

- - -

5. El objeto de la presente invención es la utilización de un determinado proceso enzimático para la clarificación de líquidos turbios o susceptibles de enturbiarse durante su almacenamiento y consiste en hidrolizar las macromoléculas peptídicas que en esos líquidos se forman y que son las principales causantes de la turbidez, actual o potencial, con ayuda de un producto enzimático proveniente de cultivo inducido de "Streptomyces".

10. Es bien conocida la importancia que la claridad o transparencia de las soluciones tiene en general, pero más específicamente en el caso de las bebidas. Pero



- también lo son los inconvenientes con que tropieza la clarificación de tales soluciones mediante técnicas meramente físicas (filtración, centrifugación, etc.), particularmente cuando en ellas hay proteínas coagulables, sobre todo si son de muy variados pesos moleculares, en cuyo caso resultan extremadamente difícil la filtración y frecuentemente ineficaz la centrifugación. Procedimientos ambos muy poco útiles en los casos de bebidas con alto contenido de extracto seco, que aumenta en ellos la densidad y la viscosidad, dos de los factores influyentes en el rendimiento del flujo en la filtración y en la clasificación en la filtración.
5. Sucede, además, que es frecuente que los líquidos clarificados únicamente mediante técnicas físicas se enturbien de nuevo durante su almacenamiento, cosa fácilmente explicable por el engrosamiento de micelas dispersas, de gran tamaño, con estructuras moleculares (por ejemplo, proteínas) ricas en puntos accesibles a enlace, bien por una verdadera sinterización, bien por enlaces de fuerzas residuales de Van der Waals, bien, sobre todo, por puentes hidrógeno, lo que explicaría la enorme importancia en la turbidez de polifenoles o taninos (como demostró claramente J. de Clerck: "Bulletin de l'Association Royale des Anciens Étudiants en Braserie de l'Université de Louvain, 68 année 1.972, nº 1, pag. 15-23). - La realidad es que la clarificación meramente física no elimina las grandes moléculas solubles, limitándose a separar aquellas cuyo tamaño exceda del crítico de la técnica empleada.
10. La biodegradación de substancias nitrogenadas por clarificación enzimática produce, en cambio, el do-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



5. ble efecto de que: 1ª, al hidrolizar el sustrato proteico sólido en moléculas menores, elimina o reduce la turbidez presente o actual, lo que por sí solo facilita ya las subsiguientes filtración o centrifugación; 2ª, al actuar sobre macromoléculas disueltas, degradándolas a pequeños péptidos, evita su posterior coagulación, ejerciendo así una acción clarificadora sobre la turbidez potencial, que hace que el líquido clarificado se mantenga transparente durante su almacenamiento.
10. Tales ventajas, así explicables teóricamente, están confirmadas en la práctica. Por ejemplo, en la de la industria cervecera, en la que hace ya mucho tiempo, casi desde principios de siglo, que se vienen empleando, para la clarificación de la cerveza, productos enzimáticos procedentes del reino vegetal, de los cuales los actualmente utilizados son, bien los obtenidos de la "Cárica Papaya", generalmente en soluciones ricas en papaína; bien concentrados comerciales del latex del higo -- ("Ficus glabrata"), que contiene ficina como producto activo. También se han propuesto enzimas hidrolizantes procedentes de hongos y de la cebada.
- 15.
20. A pesar de que, en lo que a la clarificación de líquidos turbios se refiere, son francamente buenos los resultados obtenidos con los enzimas procedentes de la papaya, los inconvenientes del empleo de tales enzimas de origen vegetal son muy grandes. En primer término, son poco estables, por ser necesario utilizarlas en soluciones enriquecidas; no son susceptibles de esterilización por tratamiento térmico, por encontrarse en solución; y su actividad sólo existe dentro de márgenes estrechos de pH. Pero, además, su precio suele ser alto
- 25.
- 30.



y, por depender de la eventualidad de las cosechas, las posibilidades de su utilización industrial están mediatizadas por la climatología, la localización de las plantaciones (que en el caso de la papaya, por ejemplo, han de ser tropicales o subtropicales); etc.

5.

Tales inconvenientes se evitan mediante lo que constituye el objeto de la presente invención, según la cual los productos enzimáticos empleados son los obtenidos por fermentación industrial inducida de microorganismos, concretamente de "Streptomyces", de cuyo caldo bien empleado como caldo de fermentación o como caldo enriquecido mediante técnicas de fermentación se separa, en estado sólido, una fracción enzimática, muy activa para la clarificación y prevención de turbidez en líquidos acuosos proteicos.

10.

15.

Tales enzimas procedentes de los "Streptomyces", además de ser productos obtenidos industrialmente a precio relativamente bajo y que, contrariamente a lo que sucede con los derivados de cosechas vegetales, que encarecen con el aumento de demanda, son más baratos -- cuanto mayor producción permita la difusión de su empleo, presentan todas las ventajas correspondientes a los que en el caso de los enzimas vegetales hemos enumerado como inconvenientes. Además de no ser tóxicas, tales proteasas procedentes de los "Streptomyces", obtenidas en estado sólido, pueden ser esterilizadas por calor seco sin pérdida importante de actividad; pueden ser manipuladas estériles por su gran estabilidad en estado seco; y aunque su empleo en estado seco tiene la ventaja de no implicar dilución del líquido a clarificar, la solubilidad de dichas proteasas hace posible obtener solu-

20.

25.

30.



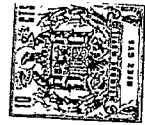
ciones estabilizables si se desea emplear el enzima por adición de líquido al líquido que se quiere clarificar.

5. Ciertamente, es claro que los líquidos a clarificar con arreglo a esta patente han de ser acuosos, aunque no es necesario que sean únicamente acuosos; y -
10. que en ellos ha de estar relacionada con la presencia - de péptidos o proteínas la turbidez de cuya clarificación se trate. Es preciso, además, que en el líquido a clarificar no haya, en cantidad tal que pueda desnaturar los, antifermentos específicos de los enzimas utilizados; ni una riqueza salina desmesurada, que pueda -
15. provocar el "salting-out" de la composición enzimática añadida al líquido turbio, ni una concentración tan alta ($\text{pH} > 11$) ni tan baja ($\text{pH} < 3$) de hidrogenones que impida la actuación de los enzimas en solución o incluso los desnaturalice. Por otra parte, cuando los líquidos turbios a tratar lleven, además de agua, disolventes orgánicos (acetonas, alcoholes, glicoles, etc.), la concentración de éstos no debe sobrepasar el valor crítico
20. que, por insolubilización del enzima añadido, provoque su inactivación o su precipitación.

OBTENCION Y DESCRIPCION DEL PRODUCTO.

A.- Obtención.

25. Los enzimas proteolíticos empleados como clarificadores se obtienen por inoculación de "Streptomyces Fradiae" en placa de agar, siembra con los inóculos en frascos de fermentación llenos de caldo nutriente es
30. t \acute{e} ril, agitación y aireación est \acute{e} ril y siembra, con el inóculo desarrollado en los frascos intermedios, de tanques fermentadores est \acute{e} riles y cargados con un caldo nutriente que contengan sales minerales, azúcares y aporte



nitrogenado suficiente para conseguir la fermentación a un pH mantenido con temperatura y aireación estéril controlada. Cumplida la fermentación, el caldo se filtra y precipita en acetona y el producto sólido, seco, contiene la actividad enzimática de los caldos.

5.

B.- Actividad proteolítica.

La actividad proteolítica se pone claramente de manifiesto haciendo actuar los enzimas frente a sustratos proteicos, que pueden ser caseína, azocaseína, queratina, hemoglobina, etc. Para la estimulación cuantitativa de la actividad enzimática resulta ser la hemoglobina un sustrato útil empleando el método de Anson (J.Gen. Physiol. 22: 79, 1938) y en nuestro caso evaluamos en unidades Anson los productos enzimáticos empleados como clarificadores.

10.

15.

Según los lotes de fabricación, el enzima proteolítico se presenta como un polvo blanquecino con una potencia de 4000-10000 UA/mg. Sometido a electroforesis, demostró separar cuatro bandas fundamentales al realizar ésta sobre gel de Agar noble (Difco) en buffers de veronal-veronal sódico a pH = 8,2 y fuerza iónica 0,035, para un recorrido de unos 80 minutos y separación de 10 cm. entre puentes salinos, con deposición de la muestra a 2 cm. del puente que conecta al ánodo consumiendo 3,5 mA/cm. de gel a un voltaje medio de 10,9 voltios/cm. y dando unas movilidades relativas según el siguiente cuadro:

20.

25.

30.

<u>Fracción</u>	<u>Mov. relativa</u>
A	0,5
B	0,7
C	0,8
D	1,0



Generalmente la proteína de la fracción A es la de mayor porcentaje (35%), repartiéndose el restante contenido proteico entre las tres restantes en cantidades bastante similares.

5. Realizando un análisis enzimoelectroforético en condiciones experimentales análogas a las descritas, se pone de manifiesto que todas las fracciones proteicas son fracciones enzimáticas, empleando también hemoglobina como sustrato de acción y revelando las manchas de digestión por coloración del fondo proteico con rojo Ponceau, que la fracción A es la mayor actividad enzimática, seguida de la C y a continuación la B y D con valores de actividad bastante parecidos entre sí.

10. Dentro de la homogeneidad de fracciones puede haber diferencias cuantitativas entre lotes de fermentación, sin alterarse por las diferentes proporciones enzimáticas los resultados de clarificación en líquidos turbios, ya que se comportan como isoenzimas con gran analogía de las fracciones entre sí, sin haberse notado diferencias sustanciales de especificidad.

15. El pH óptimo de actuación de la solución enzimática y su estabilidad está próximo al pH neutro (6-8) lo cual coincide con el valor óptimo deseable para líquidos industriales empleados en bebidas tanto en alimentación humana como animal.

20. C.- Estabilidad.

Los enzimas sólidos son, en estado seco, extraordinariamente estables a la acción de la temperatura, lo cual puede aprovecharse para su esterilización.

25. El siguiente cuadro, que se resume en la adjunta gráfica 1, indica la estabilidad a 100°C de una pro-



teasa sólida en función del tiempo de calefacción.

	TIEMPO En minutos	ACTIVIDAD en UA/mg.	% RETENIDO DE LA ACT.INICIAL
5.	0	8.532	100
	15	8.406	99
	30	8.029	95
	45	8.139	96
	60	8.411	99
10.	120	7.436	88
	180	7.684	91
	1320	6.955	82

15. La fluctuación de hábito en la curva se puede explicar por el límite de exactitud del método Anson de estimación cuantitativa de enzimas proteolíticos e incluso la aparición de un incremento en la actividad puede provenir de una pérdida en la desecación de humedad y volátiles, con el consiguiente enriquecimiento del sólido en activos.

20. La estabilidad de las soluciones de la proteasa es función de la temperatura de almacenamiento de las mismas, así como de la presencia de iones estabilizadores en el medio de actuación.

25. El ión calcio demuestra poseer una acción estabilizante notable incluso en concentraciones relativamente pequeñas. La gráfica 2 representa la actividad retenida en ordenadas frente al tiempo de calentamiento - en minutos, en abscisas, a diferentes temperaturas que figuran en cada línea de acción de la gráfica.

30. La curva análoga de estabilidad-tiempo, a temperatura ambiente en ausencia y presencia de ión calcio



se representa en la gráfica 3, en la que se representa la actividad en UA/ml. en ordenadas y el tiempo de actuación en días, en abscisas.

5. La gráfica 4 muestra la estabilidad de la solución de proteasa almacenada en frigorífico (temperatura 0-5°C) por espacio de unos tres meses y pone de manifiesto que en tan largo periodo de tiempo su inactivación es inferior al 20% de la actividad inicial en presencia de ión calcio.
10. Como resumen de los trabajos efectuados, comparando los resultados de estabilidad que se representan en las tres gráficas últimamente citadas, puede afirmarse que:
15. 1ª.- El producto es susceptible de ser manipulado como solución y de ser almacenado disuelto en industrias, como la cervecera, que dispongan de instalaciones frigoríficas ordinarias (a 5°C en tres meses, -- pérdida de actividad superior al 20% de la inicial).
20. 2ª.- Que para operaciones de clarificación y desproteínización rápida, el producto disuelto puede emplearse a diferentes temperaturas, superiores a la ambiente, sin que por un tiempo apreciable decaiga la actividad de la solución estabilizada por encima del 20%: Para 55°C el proceso máximo será de 3 horas; para 60°C, 1 hora; para 65°C aproximadamente media hora; para 70°C unos 10 minutos. Por encima de los 70°C la vida media - del enzima es del orden de minutos.
25. 3ª.- Es interesante la autodestrucción del enzima a temperatura ambiente en tiempo superior a los --
30. 100 días para soluciones con defensa cálcica y con una vida media de unos 9 días sin defensa de calcio, ya que,



- al emplearse este enzima en la industria de bebidas, se puede regular una adición suficiente para clarificar y mantener limpia en el almacenamiento la bebida clarificada, pero como se autodestruirá el enzima después de realizada su función clarificadora, no se dosificará ni sobredosificará al bebedor con productos enzimáticos activos, lo que si tal autodestrucción no sucediera, podría traer complicaciones farmacológicas, legales e incluso sanitarias. Los enzimas ultraestables en solución permanecen con acción farmacológica y enzimática detectable después de cometida su función clarificadora, por lo que al consumidor de la bebida puede manifestar efectos secundarios en la ingestión de los elaborados clarificados.

15. D.- Toxicidad.

La toxicidad del producto se ha estudiado toxicológicamente en el doble aspecto de toxicidad aguda por vía oral y toxicidad crónica por vía oral.

20. Las pruebas de toxicidad aguda se han realizado sobre ratones, empleando productos enzimáticos de muy diferentes lotes de fermentación, siguiendo el curso de la prueba en mortalidad, morbilidad y curva de crecimiento. La dosis añadida a la dieta de prueba era del orden de 1.000.000 UA/kg. de pienso. En todos los casos se apreciaba (pruebas de 10-30 días) un perfecto estado sanitario en el grupo de ratones alimentados con el pienso añadido de proteasas con mejora en la curva de crecimiento respecto al grupo testigo simultáneo y, en todo caso, con mortalidad nula.

30. Las pruebas de toxicidad crónica se han efectuado sobre pollos recién nacidos que se alimentaron --



5. con piensos adicionados del enzima proveniente de Streptomyces Fradiae, hasta su sacrificio a las 9-10 semanas de vida. En todos los casos el estado sanitario de la manada con alimentación enzimática fué igual o mejor que la manada testigo alimentada con el mismo pienso sin adición de enzimas.

10. La falta de toxicidad de los enzimas proteolíticos de Streptomyces permite su empleo en medicina y actualmente se usan en preparados farmacéuticos, asociados a antibióticos para facilitar su absorción.

DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO OBJETO DE LA PATENTE.

15. Dado el gran número de variantes posibles dentro del genérico problema de la clarificación de líquidos turbios, según cuales sean el origen de la turbidez, su intensidad, la posibilidad de modificación del pH del líquido a tratar, la termoestabilidad del mismo, su período de almacenamiento después de clarificado, la composición intrínseca misma del líquido claro, etc., es imposible, y además resultaría inútil, dar normas de talladas y uniformes de manipulación de carácter general. Esta debe adaptarse a las condiciones específicas del problema que en cada caso constituya y plantee el líquido a clarificar. Pero todas esas variantes de detalle lo serán de las normas comunes esenciales del procedimiento objeto de la patente, que pueden concretarse así:

20. La adición, al líquido a clarificar, del producto enzimático obtenido de la fermentación "Streptomyces" puede hacerse de una vez o en varias veces, lo cual, esto último, es particularmente útil cuando se
- 25.
- 30.



- trate de hidrolizar, a temperaturas relativamente elevadas, grandes moléculas nitrogenadas. El producto enzimático puede adicionarse en estado sólido, disuelto en agua o en solución acuosa, con o sin presencia de ión cálcico, o disuelto en una porción del mismo líquido a clarificar.
- 5.
- El líquido sobre el que deben actuar los enzimas no debe tener una acidez que comunique un pH inferior a 3 ni una alcalinidad con pH superior a 10. Iguales márgenes de pH deben conservarse para los líquidos de disolución en caso de añadirse el producto enzimático disuelto.
- 10.
- La concentración del producto enzimático a añadir dependerá, entre márgenes muy amplios, de la especificidad del enzima respecto del sustrato nitrogenado que ha de hidrolizar, pero generalmente la actividad enzimática varía entre 200.000 y 20.000.000 de UA/Hl. de líquido a clarificar.
- 15.
- El líquido turbio añadido del componente enzimático puede almacenarse o filtrarse con posterior almacenamiento, teniendo en cuenta que a temperaturas bajas (0-5°C), si bien la acción clarificadora es más lenta, también se prolonga la vida media del enzima, por lo que la clarificación se consigue; a temperatura ambiente (18-25°C) es más rápida la acción y mayor la caducidad, por lo que prácticamente se llega a igual efecto clarificador que en soluciones frías pero en menor tiempo. Subiendo la temperatura hasta unos 55-60°C; se acorta notablemente el proceso de clarificación y la vida media del enzima. Controlando la vida media del enzima en pruebas separadas, siguiendo la actividad por el mé-
- 20.
- 25.
- 30.



todo analítico cuantitativo de Anson, se puede predecir el momento en que, si se quiere continuar la acción enzimática a temperatura moderadamente alta, habrá que — efectuar adiciones sucesivas de enzimas para mantener — un nivel suficiente de concentración activa de enzima.

5.

Si se desea detener en cualquier momento la acción enzimática o destruir el sobrante activo de enzima remanente, por considerarlo necesario, basta con prolongar el tiempo de almacenamiento del líquido claro, — según las curvas de estabilidad que se incluyen en esta patente, calentar la solución clara durante unos minutos por encima de unos 90°C, elevar el pH de la solución clara por encima de 10 ó hacerlo inferior a 3, pudiéndose al poco tiempo reajustar el pH original.

10.

15.

Con carácter aclaratorio, pero no limitativo, del procedimiento objeto de la invención se dan los siguientes ejemplos prácticos de realización del mismo:

Ejemplo 1.

20.

DETERMINACION DEL EFECTO CLARIFICADOR DE PROTEASA DE STREPTOMYCES FRADIAE SOBRE TURBIDEZ RESIDUAL EN SOLUCIONES ACUOSAS DE GELATINA COMERCIAL FILTRADA.

TECNICA:

25.

Se determina la turbidez por la dispersión de la luz monocromática causada por las partículas sólidas dispersas (efecto tipo Tyndall) en la solución proteica.

30.

La lectura de luz dispersa se hace a un ángulo de 90° de la luz incidente y el registro de luz dispersa se verifica a la misma longitud de onda de la luz incidente. La intensidad de luz dispersa es directamente proporcional a la cantidad de partículas enturbiantes y, por lo tanto, a la turbidez del líquido.



METODO:

5. Se preparan dos soluciones de gelatina calidad comercial plata, en las concentraciones y con la técnica que más adelante se indica, y una parte de tales soluciones preparadas se adicionan de solución enzimática, preparada según se dice.

10. En todos los casos se ajusta la intensidad de luz incidente a un valor adecuado que permite el registro dentro de las condiciones experimentales que se indican, al incidir la luz monocromática sobre la solución preparada más turbia de la serie (la solución testigo). Sin modificar la intensidad de la luz incidente, se registra la intensidad de la luz dispersada para cada solución de gelatina adicionada de solución de proteasa inactivada (véase modo operatorio) y otra porción de otra solución adicionada e incubada en las condiciones que se citan con solución de proteasa activa. Esto se hace para tener un blanco de referencia en cada solución turbia llevado a igual concentración y condiciones que el problema que se estudia, a excepción, naturalmente, de la actividad enzimática presente en los problemas y ausente en los testigos.

15.

20.

25. La intensidad de la luz dispersa es un índice de la concentración de sólidos dispersantes, es decir, de la turbidez.

La longitud de onda elegida para el ensayo coincide con la longitud de onda en que la intensidad de luz dispersa es más alta.

METODO EXPERIMENTAL.

30. Preparación de solución de gelatina en Buffer de Boratos. pH = 8,2. Conc. = 0,05M.



Se pesan 75 gr. de gelatina calidad comercial plata y se adicionan en unos 700-800 cc. de Buffer de Boratos pH = 8,2, Conc. = 0,05M, que previamente se han calentado a 70-80°C, y se agita, manteniendo dicha temperatura hasta completa disolución. Se filtra la solución caliente (a 50-60°C) sobre papel y a vacío para eliminar las partículas más groseras y, una vez filtrado, se completa el volumen hasta 1 l., con buffer de Boratos.

5.

Preparación de solución de proteasa activa en

10.

buffer de Boratos.

Tres gramos de una proteasa de Streptomyces - con una actividad = 11.626 UA/mg. (unos 35 millones de UA totales), se disuelven con agitación mecánica en unos 150 ml. de buffer de Boratos (pH = 8,2; Conc. = 0,05M). La solución se filtra sobre torta de Supercel y, una vez filtrada, se completa el volumen hasta 200 ml. con el mismo buffer y se añaden como estabilizante 250 mg. de cloruro cálcico anhidro y 50 ml. de propilenglicol.

15.

La solución así preparada tiene una actividad

20.

de unas 100.000 UA/ml.

Preparación de solución de proteasa desactivada.

125 ml. de la solución anterior de proteasa activa se hierve durante 10 minutos para desactivar el enzima. Transcurrido este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se completa con buffer de Boratos - hasta el volumen inicial (125 cc.).

25.

La solución así tratada carece de actividad enzimática.

Preparación de solución de gelatina con proteasa desactivada. (Solución testigo).

30.

A 200 ml. de solución de gelatina, se añaden



50 ml. de solución de proteasa desactivada.

Preparación de solución de gelatina con proteasa activa. (Solución problema).

5. A 200 ml. de solución de gelatina, se añaden 50 ml. de solución de proteasa activa (100.000 UA/ml) - quedando la solución problema a 20.000 UA/ml.

INCUBACION.

10. Una vez preparadas las soluciones problema y testigo se introducen en estufa a 37°C y se mantienen allí durante 24 horas.

15. Transcurrido este tiempo, se sacan fuera de la estufa y se toma el sobrenadante de ambas soluciones para medir su respectiva turbidez. A simple vista, se aprecia en los líquidos sobrenadantes que la solución testigo está turbia mientras que la problema está clara y transparente.

DETERMINACION DE LA TURBIDEZ POR DIFRACCION.

20. Se empleó el espectrofotómetro ZEISS RPQ-20 - con accesorios de espectro-fluorometría de la misma casa, utilizando como fuente luminosa lámpara de xenon con alimentación estabilizada, realizándose las lecturas a amperaje constante de 2,5 A, con prefiltro enfriador y selección de luz monocromática incidente por monocromatizador de doble efecto (ZEISS MM12). Trabajando a rendija de 1,4 mm. y longitud de onda de 462 mμ.

25. La cubeta de trabajo era de cuarzo de 1x1 cm. con fondo transparente (lecturas a 90°) y el espectrofotómetro de registro se ajustó para medidas de intensidad, registrando la luz dispersa a igual longitud de onda de 462 mμ y una rendija de 1,4 mm.

30. En todos los casos se mantuvieron fijas todas



5. las condiciones que anteceden, así como la ampliación de la luz difractada y el ajuste 0-100 de intensidad nula y máxima. Se comprobó que, en las condiciones experimentales, el agua destilada limpia tiene una intensidad del 2% (correspondiente a turbidez = 0) y la solución más turbia se ajusta la lectura de intensidad, como se dice, a un valor próximo a 100.

RESULTADOS EXPERIMENTALES:

10. Se han determinado sobre 4 grupos de soluciones testigo y problema obtenidos en diferentes días.

15. De cada solución testigo y problema se realizaron 8 lecturas de turbidez y los resultados de valor medio de cada grupo, así como los márgenes de confianza para una certeza del 95% de probabilidad en la curva estadística de dispersión normal, se dan en la siguiente tabla:

	<u>SOLUCION TESTIGO</u>				<u>SOLUCION PROBLEMA</u>			
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
Nº de casos	8	8	8	8	8	8	8	8
20. V_{m+t} DS	104	101	96	101	30	41	25	20
V_m	102	96	93	96	28	39	24	19
V_{m-t} DS	100	91	90	91	26	37	23	18
Indice de - variabilidad	3%	6%	3%	5%	6%	7%	5%	4%

25. Como se vé, no hay grandes diferencias significativas entre valores medios de 4 series de cada caso (testigos y problemas), de cada grupo estadístico, lo que indica una buena reproductividad del método, por lo que se pueden resumir las 4 series de 8 lecturas en un valor único medio para cada serie que se dá en la tabla siguiente:

30.



	<u>SOLUCION TESTIGO</u>	<u>SOLUCION PROBLEMA</u>
Nº de casos	32	32
Vm+tDS	99	31
Vm	97	28
5. Vm-tDS	95	25
Indice de - variabilidad	2%	26%

ANALISIS DE RESULTADOS.

10. Como puede apreciarse en el cuadro precedente, la intensidad de la luz dispersa a causa de la turbidez, en las condiciones experimentales descritas de tratamiento y determinación, se reduce por el proceso de clarificación enzimática, objeto de la invención, de un 97 ± 2 - (próximo a valor 100) a 28 ± 3 ; es decir, se logra una clarificación de casi un 70%.

15.

Ejemplo 2.

CLARIFICACION POR FILTRACION DE SOLUCION DE -
GELATINA CON PROTEASAS DE STREPTOMYCES COMO ACELERADOR
DE FILTRACION.

20.

TECNICA:

Soluciones relativamente concentradas de gelatina pueden clarificarse por filtración empleando papeles de filtro especiales, con grueso poro, que, si bien eliminan las partículas suspensas más groseras, no logran una clarificación perfecta por el tamaño del poro. De todas formas la operación es lenta y tediosa.

25.

Una causa de la lentitud es la alta viscosidad de dichas soluciones a temperatura ambiente.

30. Con el empleo de soluciones de proteasas de Streptomyces, adicionadas a las soluciones de gelatina se consigue un marcado descenso de la viscosidad del me



5. dio que, en la manipulación de una filtración, se traduce en acortar notablemente el tiempo de filtración para conseguir, incluso con papeles ordinarios o de lenta filtración, una separación de sólido y líquido por filtración más rápida y más perfecta por permitir el uso de papeles de filtro de poro más cerrado.

METODO:

10. El método empleado consiste en determinar viscosidades y tiempos de filtración en equipos standard de soluciones de gelatina que, como se describe en el ejemplo 1, se adiciona una parte con solución activa de proteasa de Streptomyces (solución problema) y otra con la misma cantidad de solución de proteasa de Streptomyces desactivada térmicamente (solución testigo).

15.

METODO EXPERIMENTAL

Solución problema: Solución de gelatina con proteasa de Streptomyces igual que el ejemplo 1.

20. Solución testigo: Solución de gelatina con proteasa de Streptomyces desactivada igual que el ejemplo 1.

INCUBACION

En estufa de 37°C durante 24 horas, igual que en ejemplo 1.

25. Transcurrido el tiempo prescrito de incubación se retiran ambas soluciones, testigo y problema, de la estufa y se homogenizan por agitación antes de proceder a las determinaciones de viscosidad y velocidad de filtración.

30. Determinación de viscosidad: Las determinaciones se realizaron con viscosímetro de CANNON-FENSKE de doble enrase, cebado en todos los casos con igual volu-



men líquido. Constante K del viscosímetro = 0,014009 para 15,56°C = 60°F; 0,013990 para 37,78°C = 100°F; - - 0,013975 para 54,44°C = 130°F; (todos los valores de K en cSK/sg).

5. El viscosímetro limpio, introducido en baño - termostático a 20°C, se adicionaba del volumen del líquido a prueba y mantenía en el baño el conjunto hasta alcanzar el equilibrio térmico.

10. En cada determinación de tiempo de vaciado en te marcas, cronometrando con reloj cronometrador de 1/5 de sg. de lectura diferencial, se realizó una determinación con agua destilada en idénticas condiciones.

15. Cada determinación de tiempo se hace por 2 - lecturas consecutivas que en las condiciones de trabajo resultaron iguales entre sí.

RESULTADOS

20. Los tiempos de vaciado, proporcionales a la - viscosidad cinemática y, por tanto, en relación directa con el tiempo de filtración de cada problema, se resumen en la tabla siguiente donde se incluyen también los valores deducidos de viscosidad cinemática obtenidos al multiplicar el tiempo de vertido de cada solución por - la constante del viscosímetro a 20°C (dato interpolado).

TIEMPOS DE VACIADO (segundos)

	<u>Testigo</u>	<u>Problema</u>	<u>Agua destilada</u>
25. N° de casos	6	6	6
V _m +t _{DS}	469	106	75,6
V _m	358	105	74,8
V _m -t _{DS}	247	104	74,0
30. Índice de va			
riabilidad	29,6%	0,8%	1%



VISCOSIDAD CINEMATICA A 20°C (en cSK)

(K = 0,014006)

	<u>Testigo</u>	<u>Problema</u>	<u>Agua destilada</u>
Nº de casos	6	6	6
5. Vm+tDS	6,568814	1,484636	1,0588536
Vm	5,014148	1,470630	1,0476488
Vm-tDS	3,459482	1,456624	1,0364440
Indice de va riabilidad	29,57%	0,85%	1%

10. ANALISIS DE RESULTADOS

Las soluciones de gelatina de los testigos --
tienen una gran variabilidad en viscosidad cinemática.
(Valor medio = 5,014; indice de variabilidad = 30%).

15. Las soluciones de gelatina de los problemas -
(adicionados de proteasa de Streptomyces activa) se ho-
mogeneizan notablemente en cuanto a viscosidad cinemáti-
ca, que disminuye los valores de valor medio = 1,471 --
(indice de variabilidad = 0,85%) lo que representa una
disminución de la viscosidad de 70,7%, quedando la vis-
cosidad de los tratados por el procedimiento objeto de
20. la patente muy próxima a la del agua destilada (Vm = 1,048;
indice de variabilidad = 1%) (Tratados Vm = 1,471 fren-
te a valor medio agua = 1,048. Testigos sin tratamiento
Vm = 5,014 frente a Vm agua = 1,048).

25. FILTRACION

Simultaneamente y con las mismas soluciones -
en que se hacen las determinaciones de viscosidad, se -
procede a determinar el tiempo de filtración en condi-
ciones standard a través de papel de filtro procedente
30. del mismo lote de fabricación, cronometrándose el tiem-
po de recogida de 10 cc., después de haber pasado los -



5 cc. iniciales, según la técnica de Tappi, con cargas de 20 ml. del líquido filtrante.

EQUIPO

5. Tres embudos cónicos, de 55 mm. ϕ y altura — 45 mm. con vástago de 53 mm. y diámetro interno del vástago de 4 mm. terminados en tajo de pluma, se colocan — sobre probeta de 25 ml. y encima de cada uno se coloca el papel de filtro Schleicher-Schüll nº 589³, de 10 cm. de diámetro, sin plegar a excepción de una plegadura para dar al disco de papel la forma de cono exacta del embudo, que replegada sobre si mismo quedaba hacia el interior del cono y adherida a la pared del mismo.

10. A temperatura ambiente operando de uno en uno, se cronometran los tiempos en que se recogen desde el — cm. 5 del filtrado al 15. De cada solución se hicieron al menos 6 controles de tiempo de filtración y los resultados del valor medio de cada grupo, así como los — márgenes de confianza para una certeza del 95% de probabilidad en la curva estadística de dispersión normal, — se dan en la siguiente tabla:

	<u>TESTIGO</u>			<u>PROBLEMA</u>			<u>AGUA DESTILADA</u>		
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
Nº casos	6	8	9	6	6	7	6	6	9
$V_m + t_{DS}$	1.506	1.445	1.527	510	480	560	149	135	127
V_m	1.271	1.234	1.288	432	403	437	127	119	117
$V_m - t_{DS}$	1.037	1.023	1.049	354	325	314	105	103	107
100 DS/ V_m	17%	20%	24%	17%	18%	30%	17%	13%	11%

30. Como se ve no hay diferencias significativas entre valores medios de 3 series de cada caso (problema, testigos y control de agua destilada) de cada grupo estadísticamente entre sí, lo que indica una buena repro-



ductividad del método y homogeneidad en el poro de papel por lo que se pueden resumir las 3 series de 6 lecturas mínimas cada una en un valor único medio en cada serie que se dá en la tabla siguiente:

	<u>Testigo</u>	<u>Problema</u>	<u>Agua destilada</u>
5. N° de casos	23	19	21
Vm+tDS	1377	471	128
Vm	1265	425	121
Vm-tDS	1153	379	113
10. 100 DS/Vm	20,51%	22,53%	13,30%

ANALISIS DE CONCLUSIONES

15. El tratamiento enzimático, reduce considerablemente el tiempo de filtración de 1265 sg. de la solución sin tratamiento enzimático (testigo) a 425 sg. de la solución tratada por el procedimiento objeto de la invención (problema). Es decir reduce el tiempo en un 66,4% y, comparando los tiempos de filtración en proporción con el tiempo de filtración de agua en las mismas condiciones, se tiene: tiempo de filtración de testigo = 10,45 veces del tiempo de filtración en iguales condiciones de agua destilada; tiempo de filtración de problema = 3,51 veces del tiempo de filtración en iguales condiciones de agua destilada.

25. Esto pone claramente de manifiesto que el tratamiento ha sido eficaz y ha aproximado el tiempo de filtración de un líquido proteico de filtración lenta al tiempo de filtración de agua destilada pura para condiciones experimentales idénticas.

Ejemplo 3.

30. CLARIFICACION DE UN LIQUIDO VISCOSO CON ENTURBIANTE PROTEICO CON ACCION DE PROTEASAS DE STREPTOMYCES FRADIAE.



TECNICA:

Se prepara una solución viscosa de gelatina - con Buffer de Boratos que se subdivide en porciones - - iguales.

5. A cada parte alicuota se adiciona una cantidad exactamente pesada y fija de un enturbiantes sólido proteico, no soluble en la solución viscosa.

10. Cada mezcla turbia se adiciona de un volumen constante de solución de proteasa de Streptomyces con actividad por ml. variable. Se incuban las diferentes suspensiones en clarificación y finalmente se pasan a tubo de centrifuga cuyo fondo es un cilindro de menor diámetro que la porción de boca también cilíndrica, de 1 ml. de capacidad estando graduado en 0,02 ml. el pequeño cilindro distal que, logicamente, tiene el fondo cerrado en semiesfera.
- 15.

Se centrifugan simultaneamente todas las soluciones de prueba contenidas en dichos tubos idénticos - entre sí.

20. Terminada la centrifugación, el enturbiantes se encuentra sedimentado en el pequeño cilindro graduado terminal, sobre cuya graduación se puede leer el volumen aparente del sólido enturbiantes residual, que indica por lo tanto la turbidez en cada caso.

25. METODO EXPERIMENTAL

Preparación de solución de gelatina de buffer de Boratos (pH = 8,2; Conc. = 0,05M). - Se disuelven 75 gr. de gelatina calidad comercial plata en 1 l. de buffer de boratos (pH = 8,2 Conc = 0,05M) de igual modo que en el ejemplo 1.

30.

Preparación de solución de proteasa activa de



Streptomyces Fradiae en Buffer de Boratos.

5. 0,6 gr. de una proteasa de Streptomyces Fradiae con actividad de 11.626 UA/mg. (unos 7 millones de UA totales) se disuelven con agitación mecánica en unos 150 cc. de buffer de Boratos (pH = 8,2 Conc. = 0,05M). La solución se filtra sobre torta de Supercel y una vez filtrada, se completa el volumen hasta 200 cc. en el mismo buffer y se añaden como estabilizantes 250 mg. de cloruro cálcico anhidro y 50 ml. de propilenglicol. La solución así preparada tiene una actividad de unas -- 20.000 UA/ml.

Preparación de solución de proteasa de Streptomyces Fradiae desactivada (solución testigo).

15. 125 ml. de la solución anterior de proteasa activa se hierven durante 10 minutos para desactivar el enzima. Transcurrido este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se completa con buffer de boratos hasta el volumen inicial (125 ml.). La solución carece de actividad enzimática.

20. Preparación de solución de gelatina con enturbiantes de caseína y cantidades crecientes de solución de proteasa activa.

25. En 6 vasos de 100 cc. se pesan exactamente 2 gr. de caseína y se añade poco a poco en cada uno de ellos 40 cc. de solución de gelatina, agitando de forma que al principio se forme una pasta que facilite una suspensión homogénea.

30. Sobre esta serie de suspensiones se añaden: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ml. de proteasa de Streptomyces activa y 10, 8, 6, 4, 2 y 0 ml. respectivamente de proteasa de Streptomyces desactivada, de forma que el volumen fi



nal sea de 50 ml. en todas las series y que contengan - aproximadamente: 0, 40.000, 80.000, 120.000, 160.000 y 200.000 UA/vaso. Se homogeneizan bien y se introducen - en estufa para incubación.

5.

INCUBACION

En estufa a 37°C durante 24 horas, igual que en el ejemplo 1. Transcurrido este tiempo se retira de la estufa y se procede a la centrifugación.

CENTRIFUGACION

10.

Se usan 6 tubos de centrifuga cuyo fondo es - un cilindro graduado de 0,02 a 1,00 ml. de menor diámetro que la boca también cilíndrica, siendo las medidas del cilindro superior: diámetro interior: 14 mm.; altura = 52 mm.; y del cilindro inferior: diámetro interior = 2,6 mm.; altura = 50 mm.

15.

Se pasan 5 ml. de cada suspensión a un tubo - de centrifuga, después de homogeneizar bien, y se centrifuga toda la serie a la vez a 3.000 rp.m. durante 8 minutos.

20.

Después de la centrifugación se lee en la escala graduada el volumen de sedimento para cada concentración de proteasa, repitiendo 6 veces la operación para obtener una serie estadística.

25.

El valor medio, márgenes de confianza e índice de variabilidad se expresan en la siguiente tabla:

<u>UA/vaso</u>	<u>UA/ml.</u>	<u>Vm+tDS</u>	<u>Vm</u>	<u>Vm-tDS</u>	<u>100 DS/Vm</u>
0	0	0,61	0,57	0,53	6,5%
40.000	800	0,23	0,19	0,15	19,7%
80.000	1.600	0,10	0,09	0,08	11,0%
120.000	2.400	0,09	0,08	0,07	20,0%
160.000	3.200	0,06	0,06	0,06	0,0%
200.000	4.000	0,04	0,03	0,02	31,0%

30.



ANALISIS DE RESULTADOS

5. En pruebas en que la cantidad de enturbiante (caseina) era inferior a 2 gr. por alícuota, la clarificación por el enzima es total sin apreciarse sedimento detectable en el fondo del tubo centrifugado.

Se aprecia una correlación inversa entre turbidez residual y concentración de proteasa de Streptomyces: al aumentar la actividad disminuye constantemente el sedimento detectable.

10. Graduando la concentración en UA/ml. de la proteasa de Streptomyces Fradiae añadida se puede conseguir desde una clarificación total a una clarificación parcial en el grado deseado.

15. (Para todos los ejemplos precedentes -1, 2 y 3- el valor "t" se refiere a la t de Student para una probabilidad del 95% y de acuerdo con n (número de datos - que informan la media aritmética).

Ejemplo 4.

20. Quince gramos de proteasa de Streptomyces Fradiae, al estado seco, con una potencia unitaria de 11.000 UA/mg., se disuelven con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, habiendo previamente adicionado al buffers 4 gr. de cloruro cálcico seco.

25. Cumplido el tiempo de agitación, se filtra la solución enzimática por succión a través de filtro de papel ordinario cubierto "in situ" por una torta de tierra de infusorios lavada y seca de unos 5 mm. de altura.

30. Terminada la filtración, se lava la torta escurrida al vacío, por dos veces con 100 ml. de buffers, agotando después de cada lavado y recogiendo los líquidos efluyentes sobre las aguas madres de filtración. Se



homogeneizan los líquidos filtrados reunidos transparentes y se adicionan de 100 ml. de propilenglicol ajustándose el pH por adición de solución de hidróxido sódico, a un valor de 6,0.

5. Se valora la solución enzimática en actividad proteolítica por el método de Anson (J. Gen Physiol, 22: 79, 1938) y a partir del dato analítico se deduce la cantidad de buffers que hay que añadir a la solución enzimática filtrada para ajustar su potencia enzimática a - - 250.000 UA/ml.
10. Para la clarificación de cerveza se emplea esta solución adicionando 3 ml/Hl. de cerveza a clarificar, siguiendo el método americano, después de la filtración inicial, seguida a la fermentación primaria. La cerveza se almacenó 6 semanas en el tanque de acabado donde se hizo la adición de la solución enzimática.
15. Finalizado el periodo de acción se procede a la segunda filtración y a continuación se pasteuriza y acondiciona la cerveza limpia, que pasa a embotellado y almacenamiento final.
20. Los resultados de transparencia de la cerveza almacenada a temperatura ambiente y con choque térmico, se dan en la siguiente tabla nº 1, incluyéndose también los resultados conducidos paralelamente con dos preparados enzimáticos comerciales obtenidos por concentración de jugos de plantas.
- 25.

CONDICIONES DE LA PRUEBA	DURACION DE LA PRUEBA EN DIAS	INDICE DE TURBIDEZ			
		PROT. de Strept.	Prot. Vegetal 1	Prot. Vegetal	PROT. Vegetales
VIDA en ESTANDE a TEMPERATURA AMBIENTE	0	0,36	0,44	0,41	0,425
	(Brillo inicial)				
	15	0,36	0,46	0,49	0,475
	30	0,33	0,45	0,47	0,46
	60	0,28	0,49	0,47	0,48
	15	0,37	0,50	0,53	0,515
		2,7 %	8,6 %	8,0 %	0,3 %
	30	0,37	0,52	0,56	0,54
		12 %	15 %	19 %	17 %
	60	0,31	0,52	0,54	0,53
	10 %	6 %	14 %	10 %	
CHOQUE TERMICO de 60°C a 0°C	Ambiente	0,37	0,52	0,54	0,53
	0° C	0,72	1,13	1,33	1,23
		94 %	117 %	146 %	131,5 %

T A B L A No 1





5. Como puede apreciarse, el efecto de clarificación conseguido en la prueba comparativa efectuada, es claramente favorable al empleo de proteasas provenientes de *Streptomyces Fradiae*, tanto por el brillo absoluto inicial como por el mantenimiento de la solución clara, comparando los resultados con los obtenidos en el mismo lote de fabricación, clarificando con productos comerciales actualmente en uso en la industria cervecera.

10. La siguiente tabla nº 2 resume el incremento relativo de turbidez de las cervezas clarificadas con los productos comerciales hoy en uso, frente a la clarificada por el procedimiento objeto de la patente.

Porcentaje de turbidez de cervezas clarificadas con Proteasa de Streptomyces (patron = 100%), frente a Proteasas vegetales de empleo industrial en diversos periodos de almacenamiento a temperatura ambiente y con choque térmico 0-60° C.

CONDICIONES DE LA PRUEBA	DURACION DE LA PRUEBA EN DIAS	P. Streptomyces TURBIDEZ =	P. Vegetales 1 TURBIDEZ =	P. Vegetales 2 TURBIDEZ =	P. Vegetales Vm TURBIDEZ =
TEMPERATURA AMBIENTE	INICIAL = 0	100 %	122'2 %	113'9 %	118'1 %
	15	100 %	131'5% ± 3'7%	139'7% ± 3'6%	135'6% ± 3'7 %
	30	100 %	138'5% ± 2'1%	146'9% ± 4'5%	142'7% ± 3'3 %
	60	100 %	171'4% ± 3'6%	171'0% ± 3'2%	171'2% ± 0'2 %
CHOQUE TERMICO	Ambiente	100 %	140'5 %	145'9 %	143'2 %
	0° C	100 %	156'9 %	184'7 %	170'8 %
		100 %	124'5 %	155'3 %	139'9 %

T A B L A N o 2





5. Se ve claramente que la turbidez residual de filtración de cervezas es para las tratadas con proteasas de Streptomyces un 18+5% inferior a las mismas tratadas con proteasas de origen vegetal y que la turbidez originada en el almacenamiento a temperatura ambiente - va creciendo más rápidamente en las cervezas tratadas - con proteasas vegetales hasta hacerse 71% más turbias. Iguales buenos resultados comparativos se obtienen con el choque térmico.

10. Las grandes ventajas del procedimiento que se ha descrito como objeto de la patente que se solicita - pueden resumirse así:

15. 1ª.- Utilización de un producto sin toxicidad específica por vía oral a las dosis de empleo, que lo - hace aplicable en clarificación de bebidas alimenticias.

20. 2ª.- La posibilidad de facilitar la clarifica- ción por filtración o centrifugación de líquidos turbios, con turbidez incluso no proteica, cuando las macromolé- culas nitrogenadas son causa de la alta viscosidad o - densidad del líquido turbio y se degradan hidrolítica- mente por el enzima a moléculas menores con simultánea disminución de densidad o viscosidad.

25. 3ª.- Un efecto protector para evitar que apa- rezca turbidez en el almacenamiento del líquido clarifi- cado.

30. 4ª.- La especificidad de los enzimas de Strep- tomyces respecto del sustrato proteico hace que el pro- cedimiento sea particularmente adecuado para soluciones turbias en que el enturbiante sea peptídico y no haya - estructuras peptídicas que se necesiten conservar inte- gras en el líquido clarificado, ya que el enzima puede



- actuar simultáneamente sobre ellas y sobre el enturbian-
te. Pero, salvo esta excepción, el enzima deja inaltera-
das todas las demás estructuras (no carboamídicas) de -
la composición esencial del líquido, por ejemplo: azúca-
res, colorantes, edulcorantes artificiales, viscosizan-
tes de síntesis, ésteres aromáticos, etc.; es decir, a
diferencia de los tratamientos puramente químicos, no -
se altera sustancialmente la composición del líquido —
clarificado en lo que respecta a la inmensa mayoría de
sus componentes.
5. 5^a.— Incluso en el caso de líquidos clarifica-
bles que sean esencialmente proteicos y accidentalmente
turbios, la posible degradación de la proteína esencial
por la clarificación efectuada mediante este procedimien-
to no es inconveniente mayor, porque esa degradación —
lleva a productos asimilables que, al ser más fácilmen-
te absorbibles, tendrán igual o mayor poder alimenticio;
por lo que este procedimiento puede ser el más aconseja-
ble en el caso de bebidas nutritivas, incluso proteicas.
10. 6^a.— Como consecuencia de la especificidad de
acción, el procedimiento de ordinario lleva a productos
claros sin alteración de sabor, gusto u olor, del líqui-
do antes y después del tratamiento. Este punto se ha 9-
confirmado estadísticamente, con degustadores especiali-
zados, en el caso de cervezas clarificadas por el méto-
do que constituye el objeto de esta patente.
15. 7^a.— La labilidad relativa de las soluciones
de enzimas de *Streptomyces* hace posible, mediante téc-
nicas sencillas, que incluyen el simple almacenamiento,
la eliminación total de la actividad enzimática resi-
dual.
20. 8^a.— La labilidad relativa de las soluciones
de enzimas de *Streptomyces* hace posible, mediante téc-
nicas sencillas, que incluyen el simple almacenamiento,
la eliminación total de la actividad enzimática resi-
dual.
25. 9^a.— La labilidad relativa de las soluciones
de enzimas de *Streptomyces* hace posible, mediante téc-
nicas sencillas, que incluyen el simple almacenamiento,
la eliminación total de la actividad enzimática resi-
dual.
30. 10^a.— La labilidad relativa de las soluciones
de enzimas de *Streptomyces* hace posible, mediante téc-
nicas sencillas, que incluyen el simple almacenamiento,
la eliminación total de la actividad enzimática resi-
dual.



N O T A

5. Descrito suficientemente el objeto de la presente Patente de Invención -que se acoge a los derechos de prioridad de la Patente inglesa nº 19884/74, depositada en la Oficina inglesa de Patentes con fecha 6 de Mayo de 1.974-, se declara que lo que constituye su esencialidad y para lo que se pide la correspondiente protección es lo que se concreta en las siguientes reivindicaciones:

10. 1ª.- Nuevo procedimiento para la clarificación de la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos, caracterizado por basarse en el empleo de proteasas de origen microbiano y, más concretamente, de proteasas obtenidas por fermentación inducida de "Streptomyces".

15. 2ª.- Nuevo procedimiento para la clarificación de la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos, según la reivindicación anterior, caracterizado, además, por que el germen productor de las proteasas obtenidas mediante la fermentación inducida es el "Streptomyces Fradiae".

25. 3ª.- Nuevo procedimiento de clarificación de la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos, caracterizado por que un enzima proteolítico obtenido según las reivindicaciones anteriores se pone en contacto, en estado sólido o en solución, con pH entre 3 y 10, con la solución acuosa a clarificar, y se mantiene ese contacto por el espacio necesario a la temperatura de régimen para que se produzca la degradación de las macromoléculas nitrogenadas.

30. 4ª.- Nuevo procedimiento de clarificación de



la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos, según la reivindicación anterior, caracterizado, además, por que la temperatura puede ser la ambiente o cualquiera comprendida entre 0º y 85º.

5. 5ª.- Nuevo procedimiento de clarificación de la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos, según la reivindicación 3ª, caracterizado además por que las adiciones del enzima pueden ser hechas sucesivamente a lo largo del proceso de clarificación.

10. 6ª.- Nuevo procedimiento de clarificación de la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos, según la reivindicación 3ª, caracterizado, además, por que la clarificación enzimática en ella reivindicada puede ser combinada con cualesquiera de los procedimientos actualmente conocidos de filtración, decantación, centrifugación, sedimentación, etc.

15. 7ª.- Nuevo procedimiento de clarificación de la turbidez actual o potencial de líquidos acuosos.

Todo según se describe y reivindica en la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y cinco hojas debidamente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 6 de mayo de 1.975.

EL AGENTE:

P.P.