

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

Este documento se inscribe de acuerdo
con el artículo 15 de la Ley de Patentes en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

11	NUMERO	10	AI
21	461817		
22	FECHA DE PRESENTACION		

5 DEC 1978

FC- 5-10-78



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

A1 461817 78 1101 C14C 1/06

30	PRIORIDADES	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	76/25631		24-8-76		FRANCIA

4	FECHA DE PUBLICIDAD	61	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12D, C14C		

54	TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA NUEVA ENZIMA PROTEOLITICA"	

64	SOLICITANTE (S)
RHONE-POULENC INDUSTRIES	

65	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
22, Avenue Montaigne.- 75 PARIS 8° (Francia)	

72	INVENTOR (ES)
André BELILOC, Jean FLORENT, Jean LUNEL, Jean-Claude PALLA, Denise NANCY.	

66	EMPRESA (S)
RHONE-POULENC INDUSTRIES	

73	REPRESENTANTE
DON JAIME ISERN CUYAS, Abogado y Agente Oficial de la Propiedad Industrial.	

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a una nueva enzima proteolítica que se designa con el número 24 199 RP, también se refiere a su procedimiento de preparación y a la aplicación de la misma, más concretamente en Tenería, para depilar las pieles.

Se puede obtener esta nueva enzima mediante el cultivo, empleando medios artificiales, de un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y que se denomina Streptomyces Caligosus DS 14 486 (NRRL 8 195).

El producto 24 199 RP es una sustancia proteica que se presenta en forma de polvo cuyo color es pardo a negro, bastante soluble en agua, muy poco soluble en soluciones acuosas concentradas de sales neutras (por ejemplo sulfato amónico) y en mezclas hidroalcohólicas o hidroacetónicas, siendo prácticamente insolubles en alcoholes y cetonas anhidras. Su peso molecular es 27 000 y su punto isoelectrico 3,7.

La actividad proteolítica de la enzima 24 199 RP se ejerce sobre gran número de substratos de naturaleza proteica, - como la caseína, hemoglobina, fibrina (lisis de coágulos) o leche (coagulación).

Se determina la actividad sobre la caseína con una técnica parecida a la de M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947). Se valoran los péptidos solubles en ácido tricloroacético que se liberan durante la hidrólisis, mediante una espectrofotometría a 280 nm, expresándose la actividad en unidades Kunitz (U.K), o bien se determinan por medio de una colorimetría según el método de O.H. LOWRY y col., J. Biol. Chem. 193, 265 (1961), expresándose la actividad en mg. de tirosina que se forma cada minuto en las condiciones de la valoración.

La actividad coagulante sobre la leche se determina de conformidad con una técnica inspirada en la N.J. BERIDGE, - Biochem. J., 39, 179 (1945) y se puede expresar en unidades cuajo (U.C.) cuya definición es la siguiente: 1 unidad cuajo es la cantidad de enzima que coagula 10 cm³ de leche regenerada en 100 segundos.

Se determina la actividad fibrinolítica sobre un coágulo de fibrina standard producido mediante la acción de la - trombina sobre el fibrinógeno y se puede expresar en unidades líticas cuya definición es la siguiente: una solución - tiene un título de 100 unidades líticas por cm³ (100 UL/cm³) si lisa un coágulo standard de fibrina en 30 minutos.

En el cuadro I se agrupan los resultados obtenidos sobre distintos substratos con la enzima 24 199 RP de esta invención. La enzima purificada ha dado los resultados que se indican en el siguiente cuadro como ilustración:

CUADRO I

SUBSTRATO	REACCION	ACTIVIDAD
Caseína	Proteolisis (a)	1 470 UK/g
Leche	Coagulación (b)	14 500 UC/g
Fibrinógeno	Lisis de un coágulo de fibrina (c)	4 920 UL/mg

(a) reacción a pH 7,5 y a 37°C - Concentración de substrato 5 g/l

(b) reacción a pH 6,35 y a 32°C - sobre leche regenerada.

(c) reacción a pH 7,5 y a 37°C.

30.

En el cuadro II se recogen los resultados obtenidos cuando se hidroliza la caseína en función del pH.

CUADRO II

pH del medio reaccional	Actividad proteolítica sobre caseína a 37°C mg. de tirosina formada por g de enzima	
5.	3,5	220
	4,0	410
10.	4,5	900
	5,0	1 370
	5,5	1 540
	6,0	1 510
	6,5	1 930
15.	7,0	2 140
	7,5	2 270
	8,0	2 180
	8,5	1 990
20.	9,0	660

La especificidad de la enzima frente a las queratinas de los pelos así como cueros y a las glicoproteínas de los bulbos y pelos animales, no puede deducirse de las actividades observadas sobre los substratos clásicos que se han dado, por ejemplo, anteriormente, pudiéndose manifestar solamente con ensayos reales de depilación, como los que se describirán después en los ejemplos 4 y 5.

La actividad de la enzima 24 199 RP se pone de manifiesto entre un intervalo de pH amplio: el valor de pH óptimo para la hidrólisis de la caseína se halla próximo a

7,5 y la enzima conserva al menos un 60% de su actividad máxima en la zona de pH comprendida entre 5 y 8,5.

Se agrupan en el cuadro III los resultados obtenidos - al hidrolizar la caseína en función de la temperatura.

5.

CUADRO III

Temperatura del medio reaccional en °C.	Actividad proteolítica sobre la caseína a pH 7,5 mg. de tirosina formada pbr g de enzima.
25	1 360
30	1 740
40	2 230
45	2 250
50	1 770
55	680
60	200

10.

15.

20.

Se pone de manifiesto la actividad óptima de la enzima 24 199RP a una temperatura próxima a 45°C, disminuyendo rápidamente su actividad cuando la temperatura es superior a los 50°C.

25.

En el cuadro IV se recogen los resultados relacionados con la cinética de la hidrólisis de la caseína por medio de la enzima 24 199 RP, a la concentración de 10 microgramos/cm³. Se expresa la actividad en mg de tirosina formada.

30.

CUADRO IV

	Tiempo de hidrólisis en minutos.	mg de tirosina en el medio reaccional
5.	5	0,100
	15	0,300
	20	0,370
	30	0,380
10.	60	0,850
	90	1,130

El organismo productor de la enzima proteolítica 24
199 RP es una cepa de streptomyces que se ha aislado a par
15. tir de una muestra de tierra y a la que se da el número de
DS 14 586. Una muestra de esta cepa está depositada en el
Northern National Research Laboratory del Departamento de
Agricultura U.Š.A. en PEORIA, III (Estados Unidos de Amé-
rica) donde se ha registrado con el número NRRL 8 195. Se
20. puede remitir libremente una muestra de esta cepa a cual-
quier persona que se refiera a este documento.
Dicho organismo que presenta características que no han -
permitido identificarlo con ninguna especie descrita, debe
considerarse como una nueva especie y se denomina Strepto
25. myces Caligosus, DS 14 486. Se ha aislado siguiendo el mé-
todo general que consiste en suspender una pequeña canti-
dad de tierra en agua destilada estéril, diluir la suspen-
sión a diferentes concentraciones y extender un pequeño -
volumen de cada dilución sobre la superficie de placas -
30. Petri que contienen un medio de agar nutritivo. Después -

de incubar algunos días a 26°C, lo cual permite que los microorganismos se desarrollen, se separan las colonias que se desean aislar para proseguir su estudio y se siembran en agar nutritivo, a fin de obtener cultivos más abundantes.

5. El *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 forma esporas cilíndricas que miden 0,8 a 1,0 micras/0,6 a 0,8 micras. Presenta esporóforos en racimos, las esporas son generalmente bastante largas, pudiendo llegar hasta varias decenas de esporas, y se arrollan en espirales apretadas más o menos alargadas que forman en general 2 a 3 vueltas, pero frecuentemente hasta seis u ocho y pudiendo alcanzar diez vueltas. El *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 se sitúa en la Sección Spira de la clasificación de Pridham.

15. El *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 se desarrolla bien a 26°C, mal a 37°C y nada a 50°C. Presenta un micelio aéreo esporulado de color gris. La coloración de su micelio vegetativo, según los medios de cultivo, va desde color pardo más o menos intenso a pardo negruzco. Sobre medios orgánicos y especialmente agar tirosina - extracto de levadura de Waksman ("melanin formation medium"), produce en general bastante cantidad de pigmento melánico que comunica al medio un matiz obscuro, pudiendo producir un pigmento soluble negruzco en mayor o menor cantidad, sobre numerosos medios sintéticos.

25. En sus cultivos que se han efectuado a 26°C, presenta los siguientes caracteres bioquímicos:

- | | |
|----------------------------------|------------|
| - producción de melanina | : positiva |
| - producción de H ₂ S | : positiva |
| - tirosinasa | : positiva |
| 30. - licuefacción de gelatina | : positiva |

- utilización de la celulosa : positiva
 - producción de nitritos a partir de nitratos : nula sobre el caldo nutritivo nitrado, positiva sobre medios sintéticos.
- 5.
- hidrólisis del almidón : positiva
 - cultivo sobre leche desnatada : peptonización sin coagulación
- 10.

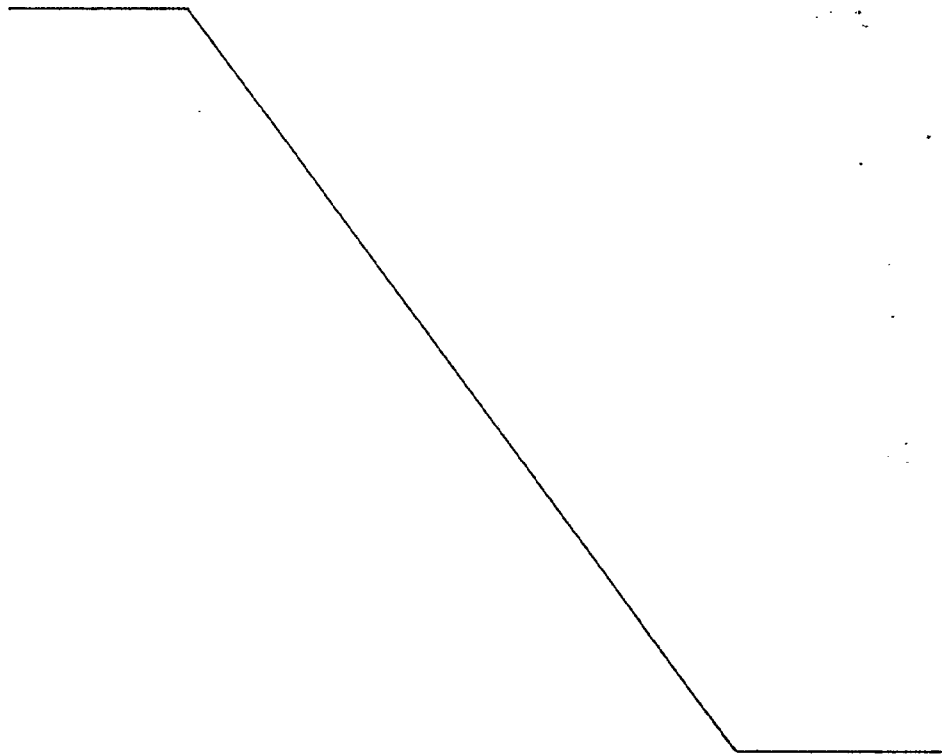
Los detalles sobre el cultivo del *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 están reseñados en el cuadro que sigue. Corresponde a los cultivos que se han desarrollado bien, es decir, aproximadamente de 3 semanas a 26°C, excepto si se indica lo

15. contrario. Se han observado estos caracteres sobre agar nutritivo y caldos utilizados habitualmente para determinar los caracteres morfológicos de las cepas de *Streptomyces*, habiéndose realizado los cultivos sobre agar inclinado, cuando se ha empleado el agar como medio. Se han preparado cierto número de medios de cultivo partiendo de las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes", S.A. WAKSMAN, p. 193-197, -
20. Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., USA., 1950, estando señalados en este caso con la letra W seguida del número que se les ha colocado en "The Actinomycetes". Las referencias o constituciones de los otros medios de cultivo -
25. son las que siguen:

- Ref. A - "Hickey and Tresner's Agar" - T.G. PRIDHAM y col. Antibiotics Annual, 1956-1957, p.950.
 - Ref. B - "Bennett's Agar" - S.A. WAKSMAN - "The Actinomycetes", vol. 2, p. 331, nº 30 -
- 30.

- "The Williams and Wilkins Comany, Baltimore, 1961.
- Ref. C - Fórmula W - 23, a la cual se añade un 2% de agar.
- 5.
- Ref. D - "Yeast Extract Agar" - T.G. FRIDHAM y col. Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950.
 - Ref. E - Tomato Paste "Oatmeal Agar" - T.G. FRIDHAM y col.- Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950
 - Ref. F - "Melanin Formation medium" - S.A. WAKSMAN -
- 10.
- The Actinomycetes, vol. 2, p. 333 - nº 42 - The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1.961.
 - Ref. G - W.E. GRUNDY y col - Antibiotics and Chem. - 2, 401, 1952.
- 15.
- Ref. H - "Inorganic Salts - Strarch Agar" - T.G. FRIDHAM y col - Antibiotics Annual, 1956 - 1957 p; 951
 - Ref. I - corresponde a la fórmula W-1 en la cual un 1,5% de glucosa reemplaza a un 3% de sacarosa.
- 20.
- Ref. J - corresponde a la fórmula W-1 en la que un 1,5% de glicerol reemplaza a un 3% de sacarosa.
 - Ref. K - corresponde a la fórmula W-18 en la cual un 1,5% de glucosa reemplaza a un 3% de -
- 25.
- sacarosa.
 - Ref. L - corresponde a la fórmula W-18 en la que - se suprime la sacarosa y se reemplaza con tiras pequeñas de papel de filtro sumergidas parcialmente en el líquido.
- 30.

- Ref. M - "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" - Society of American Bacteriologist Geneva, N.Y. - II 50-18.
- 5. - Ref. N - "Plain Gelatin" - preparada siguiendo las indicaciones del "Manual of Methods for - Pure Culture Study of Bacteria" - Society of American Bacteriologists - Geneva, N.Y. II 50 - 18.
- 10. - Ref. P - Leche desnatada comercial en polvo regenerada de conformidad con las indicaciones del fabricante.
- Ref. Q - Medio indicado para el examen de la producción de H S por: H.D TRESNER y F. GANGA - Journal of Bacteriology, 76, 239 - 244, 1958.
- 15.



Medio de cultivo.	Grado de desarrollo.	Micelio vegetativo o revés del cultivo.	Aparato aéreo (compuesto de el conjunto de micelio aéreo y de esporulación).	Pigmento soluble.	Observaciones y propiedades bioquímicas.
Agar de Hickey y Tresner (Ref. A)	Buena	Revés pardo negruzco	Blanco grisáceo a gris bien manifiesto.	Pardo negruzco.	Esporas cilíndricas que miden 0,8 a 1,04 micras, 0,6 a 0,8, esporóforos en racimos con cadenas de esporas largas que se arrollan en espirales apretadas y más o menos alargadas.
Agar de Bennett (Ref. B).	Buena	Revés pardo amarillento intenso.	Gris bastante bien desarrollado.	Gris parduzco muy intenso.	
Agar de Emerson (Ref. C).	Bastante buena	Micelio vegetativo pardo amarillento intenso.	Blanquecino y en estado de trazas.	Pardo negruzco	
Agar con extracto de levadura de Pridham (Ref. D).	Muy buena	Revés pardo negruzco	Gris intenso muy bien desarrollado.	Negro	
Agar con harina de avena y extracto de tomate de Pridham. (Ref. E).	Muy buena	Revés negro	Gris intenso muy bien desarrollado.	Negro	
Agar glucosa con peptona (N-7).	Buena	Micelio vegetativo pardo grisáceo intenso.	Blanco grisáceo. Muy moderadamente desarrollado.	Pardo negruzco	

Agar nutritivo (W-5).	Moderado	Micelio vegetativo pardo amarillento.	Blanquecino y en estado de trazas.	Pardo grisáceo	
Agar tirosina con extracto de levadura para la formación de la melanina (Ref. F)	Moderado	Micelio vegetativo negrozco	Grisáceo muy escasamente desarrollado.	Negro.	Producción de melanina positiva (lecturas efectuadas siguiendo las recomendaciones de autor)
Agar con malato cálcico de Krahnig (Ref. G).	Muy moderado.	Micelio vegetativo gris parduzco claro.	Nulo	Gris parduzco débil.	Solubilización del malato positiva.
Agar de ovalbúmina. (W-12)	Muy moderado	Revés gris parduzco	Gris muy escasamente desarrollado.	Gris negrozco	
Agar glucosa-asparagina (W-2).	Bueno	Revés negro	Blanco grisáceo a gris bien desarrollado.	Gris negrozco	
Agar glicerina-asparagina. (W-3)	Bueno	Revés negro	Blanco grisáceo a gris bien desarrollado.	Gris negrozco	
Agar almidón-sales minerales de Pridham. (Ref. H).	Bastante Bueno	Revés pardo intenso a negrozco	Blanco a gris medianamente desarrollado	Gris pardo intenso	Esporas cilíndricas que miden 0,8 micras; esporóforos en racimos; cadenas de esporas largas arrollándose en espirales apretadas y más o menos alargadas. Hidrólisis del almidón positiva

Agar almidón-nitrato (H-10)	Mediano	Revés pardo amarillento claro	Blanquecino a gris; moderadamente desarrollado	Pardo débil	Hidrólisis del almidón: positiva
Agar sintético de - Czapek con sacarosa (W-1)	Buena	Micelio vegetativo entre gris y pardo, revés pardo amarillento.	Blanquecino y en estado de trazas.	Pardo grisáceo	
Agar sintético de Czapek con glucosa (Ref. I)	Bastante bueno	Micelio vegetativo pardo amarillento, revés también pardo amarillento.	Blanquecino y en estado de trazas	Marrón claro	
Agar sintético de Czapek con glicerina (Ref. J)	Bastante bueno	Micelio vegetativo entre amarillento pardo y pardo grisáceo-negrucoso, revés pardo amarillento a pardo negruzco.	Blanco grisáceo y en estado de trazas	Pardo grisáceo.	
Caldo almidón-nitrato (W-19)	Bastante bueno	velo espeso, revés pardo claro	Blanco grisáceo moderadamente desarrollado	Nulo	Producción de nitritos: positiva
Caldo de Czapek con glucosa (Ref. K)	Moderado	Cultivo en copos y velo blanco grisáceo	Nulo	Nulo	Producción de nitritos: positiva
Caldo de Czapek con celulososa (Ref. L)	Moderado	Cultivo en copos, blanco grisáceo	Grisáceo moderadamente desarrollado sobre papel que sobresale del caldo.	Nulo	Utilización de la celulososa positiva. Producción de nitritos: positiva.

Caldo nutritivo nitrado (Ref. M)	Moderado	Anillo parduzco	Blanquecino y en estado de trazas.	Pardo muy intenso	Producción de nitritos: negativa
Cultivo sobre patata (W-27)	Buena	Micelio vegetativo espeso y arrugado, pardo muy intenso	Blanco grisáceo a gris claro. Bastante bien desarrollado.	Negro	P.s. negro que empieza a difundirse en la patata una vez que han transcurrido 24 horas de la incubación.
Gelatina pura al 12% (Ref. N)	Buena	Cultivo bien desarrollado en la superficie. Micelio vegetativo pardo intenso.	Nulo	Pardo intenso	Licuefacción de la gelatina: positiva
Leche desnatada (Ref. P)	Moderado	Anillo gris parduzco	Nulo	Pardo muy intenso	Peptonización sin coagulación - poca variación del pH que pasa de 6,3 a 6,5 en un mes.
Agar de Fresner y Danga (Ref. Q)	Moderado	Micelio vegetativo pardo negruzco	Nulo	Negro	Producción de H ₂ S: positiva (lecturas efectuadas siguiendo las recomendaciones de los autores).

El *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 presenta un conjunto de caracteres que no coinciden exactamente con los de las cepas descritas anteriormente y, por esta razón, debe considerárseles como una especie nueva.

5. Entre las especies descritas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7ª edición, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957), así como en "The Actinomycetes" (vol. 2, S.A. WAKSMAN, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961), el *Streptomyces Noboritoensis* es la especie que más se parece al *Streptomyces Caligosus* DS 14 486, efectivamente, produce como aquellos pigmentos melánicos en los medios orgánicos y desarrolla un micelio vegetativo pardo más o menos intenso a negro sobre la mayoría de los medios de cultivo, muy especialmente sobre la patata donde forma un micelio vegetativo pardo muy intenso y presenta un micelio aéreo esporulado de color gris. Sin embargo, se diferencia porque el *Streptomyces Noboritoensis* no forma cadenas de esporas en espirales regulares ni licúa la gelatina o sólo lo hace en pequeña proporción, no produce pigmento soluble o produce solamente un pigmento soluble de color pardo débil sobre el agar glucosa-asparagina y produce un pigmento soluble pardo rojizo intenso sobre agar nutritivo, mientras que el *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 forma cadenas de esporas que se arrollan regularmente en espirales apretadas, licúa la gelatina, produce un pigmento soluble negro con el agar glucosa-asparagina y da un pigmento soluble pardo grisáceo sobre agar nutritivo. Asimismo el *Streptomyces Noboritoensis* forma un micelio vegetativo incoloro con agar sintético nitrado que contiene sacarosa, en cambio el *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 forma sobre -

- este medio un micelio vegetativo espeso, entre gris y pardo, además el *Streptomyces Noboritoensis* no utiliza la - ramosa ni la sacarosa y emplea la arabinosa inosita y xilo - sa muy limitadamente, mientras que el *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 utiliza muy bien todas estas fuentes de carbono.

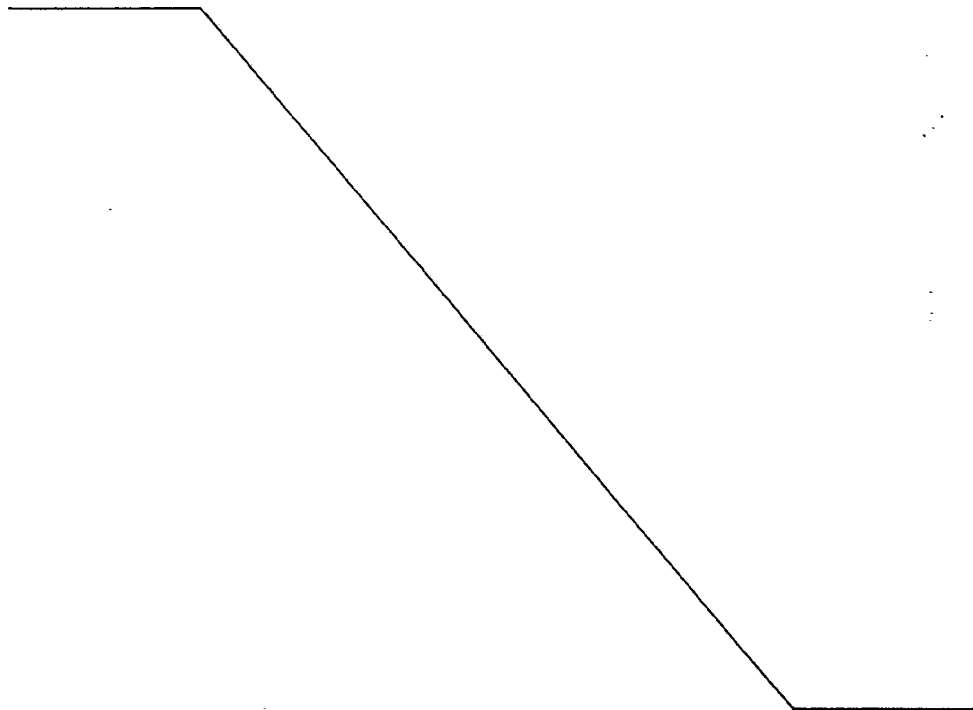
5.

La capacidad del *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 para aprovechar distintas fuentes de carbono o nitrógeno a fin de asegurar su desarrollo, se ha determinado según el método - de Pridham y Gottlieb (*J. of Bact.* 56, 107 - 114, 1948), ha - biéndose observado el grado de desarrollo sobre el medio ba - se indicado por los autores y reemplazando la glucosa por - diversas fuentes de carbono, respectivamente ensayadas, o - bien el $SO_4 (NH_4)_2$ por varias fuentes de nitrógeno.

10.

Los resultados se indican en el cuadro siguiente:

15.



Fuentes de carbono ensayadas	Utilización	Fuentes de ázoe ensayados	Utilización
5. D - Ribosa	positiva	NO ₃ Na	positiva
D - Xylosa	positiva	NO ₂ Na	positiva
L - Arabinosa	positiva	SO ₄ (NH ₄) ₂	positiva
L - Rhamnosa	positiva	PO ₄ H (NH ₄) ₂	positiva
D - Glucosa	positiva	Adenina	positiva
D - Galactosa	positiva	Adenosina	positiva
D - Fructosa	positiva	Uracila	positiva pero lenta
10. D - Manosa	positiva	Urea	positiva
L - Sorbosa	positiva	L-Asparagina	positiva
Lactosa	positiva	Glucosamina	positiva
Maltosa	positiva	Glicocola	positiva
Saccharosa	positiva	Sarcosina	positiva
15. Trehalosa	positiva	DL-Alanina	positiva
Celobiosa	positiva	DL-Valina	positiva
Rafinosa	positiva	Acide DL Aspartico	positiva
Dextrina	positiva	Acide L - Glutamico	positiva
20. Inulina	positiva	L-Arginina	positiva
Almidón	positiva	L-Libina	positiva
Glicógeno	positiva	DL-Serina	positiva
Glicerol	positiva	DL-Treonina	positiva
Eritritol	negativa	DL-Metionina	positiva
25. Adonitol	negativa	Taurina	negativa
Dulcitol	negativa	DL-Femilalamina	positiva
D - Manitol	positiva	L-Tirosina	positiva
D - Sorbitol	positiva	DL-Prolina	positiva
Inositol	positiva	L-Histidina	positiva
30. Salicina	limitada	L-Triptofano	positiva
		Betaina	

El procedimiento de preparación de la enzima 24 199 RP consiste esencialmente en cultivar el *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 sobre un medio en condiciones adecuadas y en separar el producto formado durante el cultivo.

5. Se puede cultivar el *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 - por medio de cualquier método de cultivo aerobio de superficie o profundidad, pero es preferible este último gracias a su comodidad. Con este fin se utilizan las técnicas de siembra y fermentación, así como los diferentes tipos de aparatos de uso común en la industria de las fermentaciones.

10. El medio de fermentación debe contener esencialmente - fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, elementos minerales y eventualmente factores de crecimiento, pudiéndose - aportar todos estos elementos en forma de productos bien defi
15. nidos o de mezclas complejas, como las que se encuentran en los productos biológicos de diversos orígenes.

- Se pueden utilizar como fuentes de carbono asimilables los hidratos de carbono, por ejemplo la glucosa, sacarosa, - maltosa, dextrinas, almidón u otras sustancias carbonadas -
20. que pueden ser zaúcares alcoholes (glicerol) o ciertos ácidos orgánicos (acidoláctico, cítrico). Determinados aceites - animales o végetales, como la grasa de cerdo o el aceite de soja, pueden reemplazar con ventaja estas distintas fuentes carbonadas o bien se pueden adjuntar a las mismas.

25. Son muy variadas las fuentes adecuadas de nitrógeno asi
milable. Pueden ser sustancias químicas muy sencillas, verbigracia, las sales amónicas orgánicas o minerales, la urea y ciertos aminoácidos. También pueden aportarlo las substan-
cias complejas que contienen principalmente nitrógeno en for
30. ma de prótidos: caseína, lactalbúmina, gluten y sus hidroli-

sados, harinas de soja, cacahuete, pescado, extractos de carne, levadura, destilados solubles y macerados de cereales.

- Algunos de los elementos minerales adicionados pueden tener un efecto tampón o neutralizante, como los fosfatos alcalinos o alcalinotérreos o bien los carbonatos cálcico o magnésico. Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el crecimiento del *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 y para la elaboración de la enzima 24 199 RP, como, por ejemplo, cloruros y sulfatos de metales alcalinos y alcalinotérreos. Finalmente, algunos actúan más específicamente activando las reacciones metabólicas del *Streptomyces Caligosus* DS 14 486, verbigracia, las sales de zinc, cobalto, hierro, cobre y manganeso.

- Los factores de crecimiento son productos de naturaleza vitamínica como la riboflavina, ácido fólico y ácido panto-ténico.

- El pH del medio de fermentación, cuando se inicia el cultivo, debe estar comprendido entre 5, 8 y 7,8, preferentemente entre 6,2 y 7,9. La temperatura óptima para la fermentación se halla entre 25 y 30°C, pero hay una producción satisfactoria con temperaturas que van desde 23 a 33°C. La aireación de la fermentación puede oscilar entre valores bastante amplios. Sin embargo, se ha observado que son muy adecuadas aireaciones de 0,3 a 3 litros de aire por litros de caldo y por minuto. Se alcanza el máximo rendimiento de la enzima 24 199 RP a los 2 - 3 días de cultivo, dependiendo esencialmente dicho tiempo del medio utilizado.

Es posible aislar la enzima 24 199 RP de los mostos de fermentación, operando así:

- se puede filtrar el mosto de fermentación, eventualmente en presencia de un agente de filtración, a un pH que

generalmente es el del medio al final de la fase de producción. Se concentra el filtrado obtenido hasta un volumen que sea aproximadamente 1/5 del volumen inicial, después se precipita la enzima 24 199 RP mediante la adición de un disolvente en el cual se disuelva poco, como puede ser la acetona.

5.

- se puede purificar el producto en bruto por medio de una precipitación fraccionada con la ayuda de sales minerales sólidas o soluciones acuosas concentradas, por ejemplo, sulfato amónico y/o malos disolventes de la enzima 24 199 RP, verbigracia, acetona. También se puede purificar el producto mediante diálisis a través de una membrana, preferiblemente una membrana de celulosa regenerada.

10.

La presente invención se refiere asimismo a las aplicaciones de la enzima 24 199 RP.

15.

La enzima 24 199 RP es especialmente útil en la industria de la Tenería donde se puede emplear para depilar las pieles animales con miras a la preparación de cueros.

20.

Se puede utilizar la enzima 24 199 RP en estado puro para esta aplicación especial, pero debe tenerse en cuenta que se obtienen resultados equivalentes empleando una enzima que se encuentra en forma semipurificada.

25.

Hasta hoy día se depila siguiendo métodos bien conocidos, los que se utilizan más corrientemente consisten en tratar las pieles mediante baños o pastas alcalinas reductoras, que están constituidos particularmente por cal y sulfuro sódico. - Este procedimiento de depilación no da lugar a la separación del pelo por medio de la destrucción de sus conexiones con la piel, sino que produce la disolución de aquel en el baño de tratamiento que debe renovarse después de cada operación.

30.

Entonces es preciso eliminar el agua que está muy cargada de

- sulfuro y productos orgánicos y cuyos requerimientos químicos y biológico de oxígeno (RQO y RBO) son muy elevados. En la actualidad se desecha el agua mencionada haciéndola pasar a los sistemas clásicos de vertido y provocando así una polución muy importante de ríos, riachuelos, etc... Ciertamente que medios de depuración potentes permitirían disminuir los RQO Y RBO, sin embargo, el coste de su instalación y funcionamiento es muy grande, de modo que esta solución es evidentemente onerosa. Una de las ventajas esenciales de la presente invención es disminuir hasta aproximadamente la mitad, la polución debida a la depilación clásica. El depilado de pieles por medio de enzimas que se fijan en la parte epidérmica que une el pelo con la piel, permite recuperar dicho pelo mediante una sencilla filtración del baño de depilación, sin que se produzca polución.
- 5.
- 10.
- 15.

- Otra ventaja del procedimiento de conformidad con la invención, respecto a los procedimientos clásicos de depilación enzimática, es que permite recuperar el pelo intacto sin deteriorarse el cuero. Efectivamente, la depilación enzimática, tal como actualmente se practica, provoca una importante degradación de la epidermis e incluso en la dermis de las pieles tratadas que dan posteriormente cueros de mala calidad. Ello se debe a que hasta hoy el especialista no disponía de una enzima cuya acción fuere específica sobre la conexión pelo-piel. En estas condiciones la enzima ejerce también su acción sobre las proteínas existentes en las capas profundas de la piel, pero el cuero que se obtiene en un tratamiento posterior presenta una flor alterada, venas y cavidades.
- 20.
- 25.

- Esta ventaja es muy interesante en el caso de la depilación de ovinos.
- 30.

En relación con el procedimiento clásico para la depilación de pieles de carnero mediante calentamiento, el depilado con la enzima correspondiente a esta invención permite obtener la lana y la piel intactas.

5. Según una preparación general, cuando se tratan las pieles de bovinos, el procedimiento de depilado enzimático de la invención consiste en poner en contacto la piel que se trata con la enzima, dentro de un recipiente de depilación donde el porcentaje de agua respecto a piel, se halla entre 10 y 45% en volumen y, preferentemente, entre el 20 y 25%. La operación dura aproximadamente 3 a 24 horas, la temperatura del baño debe estar comprendida entre 24 y 30°C, preferiblemente, y el pH del baño ha de corresponder a la actividad proteolítica máxima de la enzima, es decir, tiene que encontrarse entre 7 y 8,5 aproximadamente, debiéndose mantener el pH constante en el transcurso de la operación con la ayuda de una solución tampón obtenida habitualmente adicionando fosfato trisódico o bórax. Por otra parte, se puede considerar que las condiciones de eficacia y coste son óptimas, cuando se utiliza un serie de relaciones ponderales que oscilan entre 0,3 a 1 parte de enzima correspondiente a la invención, para 100 partes de pieles.

25. Generalmente se procede, en la práctica, a tratar las pieles sumergiéndolas en una solución que contiene de 10 a 30 g/l de la enzima 24 199 RP cuyo título es de unos 290 UK/g, o bien aplicando a pistola una solución que contiene 1 a 10 g/litro de la mencionada enzima 24 199 RP cuyo título esté alrededor de 290 UK/g, en el caso de las pieles de ovinos.

30. La actividad de la enzima empleada es óptima cuando su concentración y título corresponden a las proporciones indi

cadras anteriormente, en ambos casos de bovinos y ovinos.

Se puede emplear como recipiente para la depilación cualquier tina o bombo, como los que se utilizan en las técnicas conocidas. Puede estar dotado ventajosamente con un dispositivo de agitación intermitente capaz de mejorar el reparto de los reactivos sobre la piel. Se han conseguido resultados muy satisfactorios con velocidades de agitación del orden de $3/4$ de revolución por minuto.

5. A fin de que la eliminación del pelo de la piel sea completa, se realiza un arranque mecánico del pelo, por cualquier medio adecuado, que acompaña o sigue a la acción de la enzima. Puede consistir, sencillamente, en el roce de las pieles entre sí cuando se agitan durante el proceso, completado eventualmente con un raspado que se consigue durante un corto período de agitación más intenso. Asimismo pueden pasarse las pieles tratadas con este procedimiento a través de una máquina raspadora que permite recuperar las pieles intactas y sin vello.

10. Gran número de operaciones anexas pueden preceder y/o seguir al procedimiento de la invención. Es conveniente la limpieza de las pieles antes del depilado. Puede consistir en un lavado con agua en el bombo o en la coudruse, destinado esencialmente a eliminar la sal que impregna la piel para su conservación. Puede seguir al lavado un desengrasado con la ayuda de disolventes clásicos, aromáticos o clorados, o con detergentes en solución acuosa. Dicha operación permite eliminar gran número de impurzas orgánicas, como las grasas, y minerales que manchan la piel y obstruyen los folículos pilosos. Es conveniente que siga al desengrasado un nuevo lavado con agua, a fin de obtener una piel lo más limpia

15.

20.

25.

30.

que se pueda, exenta de impurezas y productos de limpieza.

Después de estas operaciones de preparación de las pieles, puede ser útil efectuar un precurtido que refuerza la protección de la dermis contra la acción de las enzimas en profundidad. Dicho precurtido debe ser muy débil, de manera que el pelo no quede fijo. Son muy convenientes para este fin los mono o dialdehidos, por ejemplo, el formol.

Una vez depiladas las pieles, se lavan y escurren, Las aguas del lavado contienen los pelos intactos y la enzima, que pueden separarse con la ayuda de cualquier medio conocido, como decantación y filtración.

Luego se introducen las pieles generalmente en un baño depilatorio de cal pura que las hidroliza. Este baño puede volver a utilizarse varias veces, ya que las pieles que se colocan en el mismo están casi limpias y lo ensucian muy poco.

Después del tratamiento en este baño depilatorio, se observa que la flor de las pieles no está alterada y se adhiere perfectamente a la dermis, mientras que una piel depilada mediante enzimas libre presenta su flor deteriorada, su tacto es gelatinoso y está despegada de la dermis en algunas zonas, hallándose esta última también atacada.

Durante la operación de depilación propiamente dicha, se reducen considerablemente los desechos de productos contaminantes. Esto se observa especialmente en el caso de los sulfuros de los que no se encuentran trazas, ni de los pelos di sueltos en las aguas de lavado, que abundan sin embargo, en los residuos procedentes de los procedimientos depilatorios por disolución del pelo. Además la enzima, recuperable fácilmente por filtración, no es eliminada con los líquidos que

salen.

Después de tratar las pieles por el procedimiento de conformidad con la invención, se pueden realizar todas las operaciones clásicas de Tenería como, por ejemplo, el proceso de desencalado, piclado, curtición al cromo, serrado y -

5.

surcado, encurtido, alimentación, desecado, sobado y acabado.

Los cueros obtenidos presentan entonces un grano muy fino, su calidad es superior a la que se consigue mediante el método cal-sulfuro, ausencia de venas, lográndose finalmente una buena adherencia de la flor hasta en las piezas obtenidas de los costados de animales.

10.

Seguidamente se expone un cuadro comparativo de los resultados obtenidos en el depilado de pieles de bovinos, según los tres procedimientos que se señalan a continuación:

15.

- A) Procedimiento de conformidad con la invención: se emplea la enzima 24 199 RP, según el ejemplo 4 que se citará después.

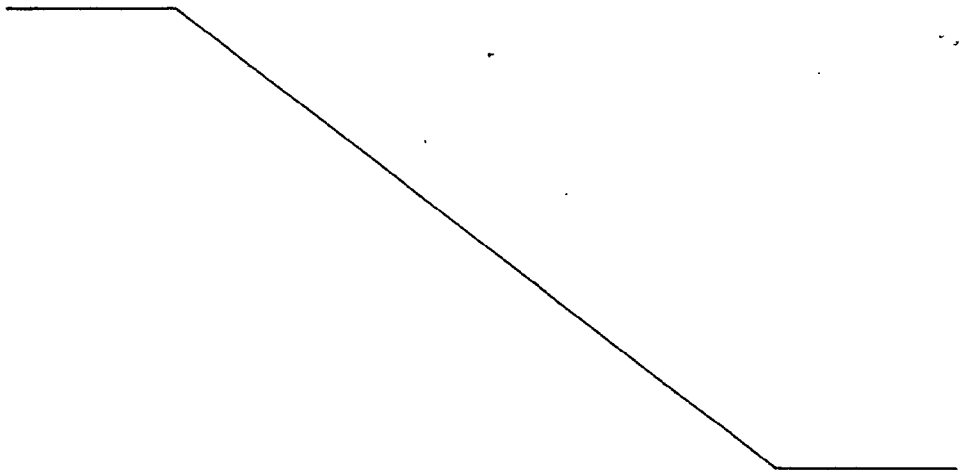
- B) Procedimiento que utiliza enzimas libres.

20.

- C) Procedimiento de disolución del pelo en un baño que contiene cal y sulfuro sódico.

25.

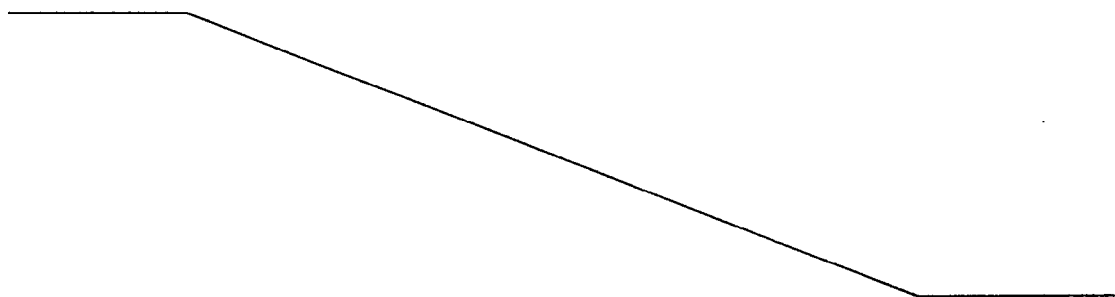
30.



	C	A	B	
	Depilado por medio de cal-sulfuro.	Procedimiento de conformidad con la invención Enzima 24 199 RP	Depilado por medio de enzima libre.	
5.	Aspecto de la flor: -foliculos pilosos -superficie	definidos nivelada	muy definidos redondeada	poco definidos muy nivelada
	Tacto	suave	algo firme	algo firme
	Flexibilidad	buena	buena	buena
10.	Revestimientos en los costados	escaso	bueno	regular
	Adherencia de la flor	mala en los costados	muy buena en todas las partes	mala en los costados
15.	Resistencia a la tracción en Kg/mm ²	1,4	1,5	1,5
	Alargamiento de rotura %	59	65	65
20.	Flecha de agrietamiento en mm	7,2	7,4	7,5

25.

30.



La felcha de agrietamiento, medida con un Lastómero, ca racteriza la aptitud de un cuero para resistir plegamientos, cuando están sometidos a una tensión.

5. Los ejemplos isugientes, no limitativos, muestran el modo de llevar a cabo la invención en la práctica. La actividad de los productos se expresa en unidades Kunitz (U.K) que ya se han definido. Dicha actividad se expresa en U.K./cm³ - cuando se trata de un producto disuelto y en U.K./g si se trata de un producto sólido.

10. EJEMPLO 1 - FERMENTACION:

En un fermentador de 170 litros se carga:

15. - peptona : 1 200 g
- extracto de levadura 600 g
- agar 240 g
- agua c.s.p. 105 litros.

20. El pH del medio es 6,55. Se esteriliza haciendo pasar vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de entriar, debido a la condensación del vapor durante la esterilización, el volumen del caldo es de 115 litros, completándose el mismo hasta 120 litros mediante la adición de 5 litros de una solución acuosa estéril que contiene:

- glucosa monihidrato : 1 200 g

25. El pH del medio es 6,50. Se siembra con 200 cm³ de un cultivo de Streptomyces Caligosus DS 14 486 en matraz enlenmeyer agitado. El cultivo se desarrolla a 27°C - durante 23 horas, agitando y aireando con aire estéril, en estas condiciones es apto para la siembra del cultivo productor.

30.

El cultivo productor se realiza en un fermentador de 800 litros, cargado con las siguientes sustancias:

- | | | |
|----|------------------------|--------------|
| | - destilados solubles | : 16 Kg |
| | - sacarosa | : 6 Kg |
| 5. | - aceite de soja | : 4 litros |
| | - sulfato de manganeso | : 0,08 Kg |
| | - agua | : 370 litros |

Se ajusta el pH a 7,3 adicionando 850 cm³ de sosa 10 N, después se esteriliza el medio haciendo pasar vapor a 122°C durante 40 minutos. Una vez frío y debido a la condensación del vapor durante la esterilización, el volumen del caldo es de 400 litros, siendo el pH 6,60.

Seguidamente se siembra con 40 litros del cultivo inóculo en el fermentador de 170 litros que se ha descrito antes. El cultivo se desarrolla a 27°C durante 94 horas, mientras se agita con la ayuda de una turbina que gira a 205 revoluciones por minuto y se airea con un volumen de aire estéril de 20 m³/h, entonces el pH del cultivo es 7,30 y el volumen del mosto 400 litros. La actividad proteolítica del mosto a pH 7 y a 37°C es de 3,7 UK/cm³.

EJEMPLO 2 - EXTRACCION:

Se filtran 11 litros del mosto obtenido en el ejemplo 1 y se lava la torta de filtración con 4 litros de agua destilada. Se reúne el filtrado con los líquidos del lavado y se concentran hasta 2 litros a presión reducida (5 mm de mercurio) sin sobrepasar los 30°C. Se añaden rápidamente con agitación 2,4 litros de acetona, enfriada previamente a -10°C al concentrado que se ha enfriado a +4°C. Se sigue agitando durante 2 minutos y después se separa por centrifugación el producto insoluble formado, a +4°C y a 5 000 g durante 10 mi

nutos. Se extrae el residuo obtenido sucesivamente con 450 cm³ y 150 cm³ de agua a 4°C durante 2 horas, separándose cada vez la parte insoluble por centrifugación a +4°C y 5 000 g durante 10 minutos. Se obtiene un total de 800 cm³ de extracto acuoso cuyo pH está comprendido entre 7 y 7,5.

5. Se mantiene este extracto a 4°C y se adicionan agitando 344 g de sulfato amónico cristalizado, se agita también 15 minutos, después de terminar la adición, se deja en reposo durante una hora y se aísla la porción insoluble activa mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos y a +4°C. Se disuelve el residuo agitándolo durante una hora con 500 cm³ de agua, ajustando el pH alrededor de 7 - 7,5 y dializando la solución obtenida a +4°C, durante 17 horas, frente a agua destilada.

10. Se obtiene 920 cm³ de extracto dializado en el que se vierte 1,1 litro de acetona, enfriada a - 10°C, rápidamente y agitando. Se separa la enzima insolubilizada por medio de centrifugación a 5 000 g, durante 10 minutos a +4°C, se seca a presión reducida y a +4°C en presencia de un agente deshidratante (P₂O₅).

15. Se consiguen finalmente 9,5 g de enzima 24 199 RP que presenta las siguientes actividades enzimáticas:

- actividad proteásica	: 1 470 UK/g
- actividad coagulante	: 14 500 UP/g
25. - actividad fibrinolítica	: 4 920 UL/g

EJEMPLO 3

Se filtran sobre filtro prensa y en presencia de 25 Kg de coadyuvante de filtración, 360 litros del mosto obtenido en el ejemplo 1. Se añaden 400 litros de metanol, enfriado a - 10°C, a 200 litros de filtrado. Después de enfriar la mez-

a unos - 10°C, se separa el precipitado obtenido mediante cen-
trifugación en frío y se seca bajo presión reducida a 35°C.

Se aislan 229 g de 24 199 RP en bruto de título 290 UK/g.

EJEMPLO 4 - APLICACION AL DEPILADO DE PIELLES DE BOVINOS:

5. Se separa la sal de las pieles saladas recientes de los bóvidos (100 kg), agitando 2 veces durante 30 minutos con un 200% de agua pura (los porcentajes están expresados respecto al peso de pieles saladas) y después se ponen en remojo.

Se agitan las pieles separadas de su sal durante 20 horas a una temperatura comprendida entre los 20 y 25°C con un 200% de agua a la cual se ha añadido el 0,2% de sosa en lentejuelas y 0,05% de proteasa alcalina S 1 200. Luego se descarnan las pieles y se procede al depilado.

Se colocan las pieles descarnadas en un bombo que gira a la velocidad de 3 a 4 revoluciones por minuto durante 1 hora. Se adiciona un 20 a 25 % de agua y 300 a 400 g de enzima 24 199 RP de título 290 UK/g. Se ajusta la temperatura dentro del bombo a 30°C. Se agita, de la manera que se describió antes, durante 1 hora y después intermitentemente durante 8 a 9 horas. Entonces se elimina el pelo a la perfección frotándolo con el revés de una hoja.

Seguidamente se procede al raspado por cualquier medio adecuado propio de la industria de la Tenería.

Se depila la tripa así obtenida de un modo prácticamente total con la excepción de algunos pelitos demasiado cortos que escapan al trabajo mecánico de la hoja.

Se tratan ahora las pieles de modo conocido con un 200% de un baño depilatorio obtenido a partir de un 3% de cal y - 1,5% de sulfuro sódico. Este tratamiento tiene por objeto -
30. obtener pieles perfectamente depiladas que pueden sufrir las

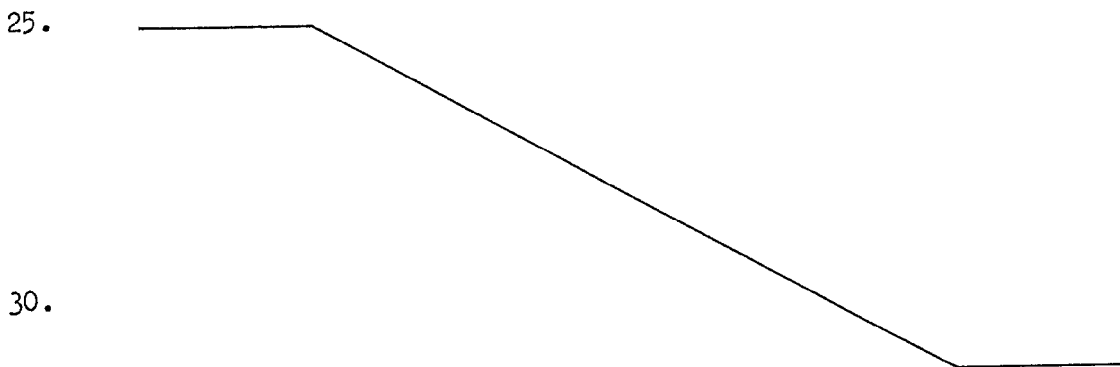
operaciones posteriores del proceso de tenería.

5. Se puede reciclar el baño depilatorio el cual está poco cargado. Las pieles obtenidas después del encurtido, zurrado y acabado, tienen el aspecto muy hermoso y la flor fina, entera y brillante, así como muy adherente, al revés de lo que sucede con las pieles tratadas ordinariamente con las proteasas.

EJEMPLO 5 - APLICACION A LA SEPARACION DE LA LANA DE CARNEROS

10. Después del reverdecido de las pieles de carnero, examinado y secado, se aplican a pistola, sobre el lado carne de cada piel, 150 cm³ de una solución acuosa que contiene de 5 a 6 g/litro de enzima 24 199 RP de título 290 UK/g, tamponeada con fosfato disódico a pH 8,5. Se apilan las pieles de manera que el lado carne quede junto a lado carne en un recinto donde la humedad relativa no exceda del 85 % y la temperatura se mantenga entre 24 y 26°C. A las 16 a 20 horas se efectúa fácilmente la separación de la lana empleando los medios corrientes.

20. La lana obtenida es de calidad excelente lo mismo que la piel restante que no ha perdido su flor, a diferencia de las pieles conseguidas según el procedimiento de "calentamiento". Seguidamente se puede pelar la piel y posteriormente se curte ésta y se acaba, de conformidad con los procedimientos corrientes.



N O T A

Hecha la descripción del presente invento se hace constar que esta solicitud se acoge a la prioridad de la solicitud alemana nº 76/25631, depositada el 24 de Agosto de 1976, y que se declaran como nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones.

5. 1. - Procedimiento para la preparación de una nueva enzima proteolítica, destinada esencialmente al depilado enzimático de pieles animales y designada por el número 24 199 RP constituida por una sustancia proteica que se presenta bajo la forma de polvo de color marrón a negro, de masa molecular igual 27.000 y de punto isoelectrico 3,7; bastante soluble en agua, muy poco soluble en soluciones concentradas de sales neutras y en mezclas hidroalcohólicas o hidroacetónicas y prácticamente insoluble en alcoholes y en octonas anhidras; que presenta sobre la cascina a pH 7,5 un máximo de actividad a 45°C; que ejerce una actividad coagulante sobre la leche y actividad fibrinolítica sobre un coágulo de fibrina; ejerciendo una particular actividad frente a las queratinas de pelos y cueros y a las glicoproteínas de bulbos y pelos, caracterizado en que se cultiva aeróbicamente en las condiciones habituales sobre un medio adecuado que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno asimilables, el *Streptomyces Caligosus* DS 14 486 asequible bajo la referencia NRRL 8 195 y que se le separa de la enzima formada en el curso del cultivo.

2. - Procedimiento, según la reivindicación 1,

caracterizado en que el medio de cultivo tiene un pH inicial comprendido entre 5,9 y 7,8.

5. 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado en que el medio de cultivo tiene preferentemente un pH inicial entre 6,2 y 7,4.

4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado en que el cultivo se efectúa a una temperatura comprendida entre 23° y 33°C.

10. 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado en que el cultivo se efectúa preferentemente a una temperatura comprendida entre 25° y 30°C.

6.- Procedimiento para la preparación de una nueva enzima proteolítica.

15. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 33 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 23 de Agosto 1977

p.a.

JAIME ISERN

p.p.


Firmado por JOSE F. NIETO