



Concedido el Registro de acuerdo
con los datos que figuran en la pre-
sente descripción y según el con-
tenido de la Memoria adjunta.

11	ES	10	A1
21	N.º MEMORIA 462686		
22	FECHA DE PRESENTACION		

5 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL <i>C12D; A23J</i>	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
64 TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA EL ABLANDAMIENTO DE ESTRUCTURAS PROTEICAS, RIGIDAS O SEMIRIGIDAS"		
71 SOLICITANTE (S) INSTITUTO DE FARMACOLOGIA ESPAÑOLA, S.L. (Fundación Marqués de Urquijo).		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE C/ Alcalá, nº 95.-Madrid		
72 INVENTOR (ES) D. Ricardo Segura Ferns, domiciliado en Madrid, calle de Nuñez de Balboa, nº 13.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE D. MANUEL DIAZ VELASCO		

**POOR
QUALITY**

No necesita ponderarse, por ser sobradamente conocida, la importancia que tiene el reblandecimiento de proteínas estructuradas con alto grado de dureza, a fin de rebajar este a límites adecuados para su uso o consumo.

5.

Particularmente, el ablandamiento de carnes duras, para facilitar su masticación, ha sido previamente estudiado mediante la utilización de proteasas vegetales, bien aislandolas a cierto estado de pureza, bien administrando las fuentes naturales de dichas enzimas o proteasas, es decir, los vegetales que los producen como jugos o frutos íntegros (caso, por ejemplo, de la piña tropical).

10.

Desgraciadamente, las plantas productoras de enzimas ablandadores (papaina, bromelina, etc.) son, en general, de origen tropical y de muy escaso cultivo en otras latitudes.

15.

Mediante el procedimiento que constituye el objeto de la presente Patente de Invención se obtienen resultados satisfactorios en el ablandamiento de proteínas, consistiendo tal procedimiento en la utilización de enzimas obtenidos por fermentación de microorganismos, sin necesidad de complicar las técnicas convencionales de tratamiento y con la posibilidad de operar con productos estériles que eviten posibles contaminaciones patógenas.

20.

25.

Entre los enzimas microbianos seleccionados se muestran particularmente interesantes los producidos por el género "Streptomyces" y, de entre ellos, por su alta estabilidad frente al calor, en estado seco, los enzimas separados de cultivos de Streptomyces fradiae.

30.

- Las técnicas de adición del enzima al sustrato proteico a ablandar varían desde la simple adición por espolvoreo de los enzimas microbianos en estado sólido -o de sus mezclas con productos no tóxicos, inertes o potenciadores de la acción o la palatabilidad (para -tratamiento de proteínas comestibles)- sobre el sustrato jugoso (carnes) o humedecido (proteínas rehidratadas), hasta la inyección de soluciones enzimáticas estériles, no letales, en el animal vivo (para el caso de carnes) antes del sacrificio, de tal forma que el riego sanguíneo reparta el enzima inyectado por los paquetes musculares que se desean ablandar, para que el efecto desablandamiento tenga lugar "post mortem", principalmente en el período de cocción y refrigeración de los canales.
5. Otros procedimientos intermedios de administración del enzima pueden ser la impregnación con soluciones, la multi-inyección dosificada de la solución enzimática espaciada en la estructura proteica a reblandecer o la simple adición de mezclas de enzimas, mezclas de éstos -con productos adecuados o soluciones enzimáticas a triturados proteicos debidamente amasados para conseguir una homogeneidad y buen reparto del enzima con el sustrato.
10. La cantidad a añadir de enzimas proteolítico de *Streptomyces fradiae*, por unidad de peso de la proteína a ablandar, vendrá determinada, en cuanto al enzima, por su actividad unitaria, por su especificidad para el sustrato proteico, por el pH de acción, por el tiempo de acción y por la temperatura a la que se deje actuar el enzima, además de por el método de adición (espolvoreo, inyección, etc) seleccionado de entre los convencionales.
15. En cuanto al sustrato de acción, la dosis del
- 20.
- 25.
- 30.

enzima vendrá influenciada, aparte de por las incidencias que el sustrato exige en algunas de las variantes ya citadas (pH, tiempo, temperatura de acción, etc), por su propia constitución proteica, por el grado de dureza de la estructura proteica a ablandar y por el reblandecimiento que se desea alcanzar con el tratamiento.

En resumen, si bien el procedimiento es único en esencia, las diferentes posibilidades de su empleo obligan a tener en cuenta la interacción fundamentalmente entre dureza inicial, concentración enzimática, pH, tiempo, temperatura de acción, procedimiento de adición y reblandecimiento deseado para la correcta dosificación y condiciones del proceso de ablandamiento.

Lógicamente, no pueden ser iguales las condiciones ni concentraciones iniciales para el ablandamiento de un cuero, que las necesarias para reblandecer una carne hasta el grado de cómoda trituración o fácil deglución - aunque, en esencia, el procedimiento sea el mismo, pues siempre se trata de conseguir una hidrólisis enzimática que rompa unas estructuras rígidas a otras menores, menos estructuradas y más blandas, actuando como catalizador - el enzima proteolítico obtenido desde microorganismos por la industria de la fermentación.

El grado de ablandamiento alcanzado puede llegar en determinadas proteínas estructuradas, tras su cocinado, hasta pastas o hidrolizados fluidos que, en el caso de las carnes, conserven el poder nutritivo como aporte proteico, facilitando la digestibilidad y asimilación del producto original.

Para la utilización adecuada del enzima proteolítico, hay que tener en cuenta su estabilidad, tanto al

estado sólido como en soluciones.

5. Para el caso de proteasa de *Streptomyces fra-*
diae, la curva de estabilidad (Gráfica 1), que resume los
 valores de la Tabla 1, pone de manifiesto que el enzima
 puede esterilizarse en seco, sin pérdida notable de acti-
 vidad.

10. En cuanto a las soluciones, la estabilidad de
 la actividad enzimática varía en función de la temperatu-
 ra y el pH. Las Tablas II a V y Gráficas 2 a 5, resumen
 los estudios de estabilidad en las condiciones de pH, -
 temperatura y concentraciones que en cada caso se indican.

15. Puede apreciarse que para pH muy frecuentes -
 (próximos a la neutralidad) el enzima tiene una estabili-
 dad suficiente para una adecuada actuación, pero que --
 después de un periodo no excesivo de tiempo se inactiva,
 con lo que se consigue, por una parte, evitar una acción
 indefinida de lisis que podría traducirse en una degrada-
 ción desmesurada del sustrato proteico a ablandar y, por
 otra parte, para el caso de tratamiento de productos ali-
 menticios, es interesante que, al autodestruirse al esta-
 do de solución en un tiempo prudencial, se evita una do-
 sificación indeseable para el ingerente.

20. La estabilidad del enzima de *Streptomyces fra-*
diae al estado seco es prácticamente indefinida en perio-
 dos y condiciones de almacenamiento normales, lo cual es
 una ventaja frente a otros enzimas de origen vegetal, por
 ejemplo, la papaina, que frecuentemente, incluso al esta-
 do seco, pierde su acción enzimática coaguladora y hay -
 que activarla con productos químicos, no siempre admiti-
 dos en los Códigos Alimentarios.

30. En cualquier caso, los enzimas de *Streptomyces*

y, más concretamente, el de *Streptomyces fradiae*, no son tóxicos, incluso a altos niveles, aunque conserven su actividad inicial y se vienen empleando asociados a antibióticos desde, hace años, por la industria farmacéutica.

5. La esterilización de soluciones se puede hacer por pasteurización, en cuyo caso habrá que sobredosificar el enzima según las condiciones de tiempo y temperatura a que se pasteurice, incrementando en la solución inicial las pérdidas de actividad que se deduzcan, bien de un estudio experimental, bien de las gráficas que se incluyen, para que la solución estéril quede a la actividad deseada.

10. Un método aconsejable para esterilizar soluciones de este tipo de enzimas es el de filtración esterilizante, en el cual no hay alteración de la actividad unitaria de la solución.

15. Con carácter descriptivo, pero no limitativo, del procedimiento objeto de la invención, se dan unos ejemplos del empleo de estas enzimas como reblandecedores de carnes duras. En todos ellos se utiliza la metodología general común que a continuación se expresa, a fin de objetivar al máximo los resultados obtenidos.

Metodología general

20. 1) Selección de carnes.— Se eligieron piezas — pares de carne de animales viejos recién sacrificados y sometidos a la prueba al finalizarse el proceso de oro.

De cada dos piezas pares del mismo animal, siempre se dedica una ("testigo") a control, reservando la otra ("tratado") a tratamiento enzimático.

30. Testigos y tratados se manipularon como se especifica en cada ejemplo, simultáneamente y con idéntico

proceso, a excepción naturalmente de la adición enzimática en el caso de los testigos.

En todos los casos la carne de los testigos — fue calificada por el equipo degustador como "muy dura".

5 2) Técnica empleada para el cocinado de la carne.— En los casos de fritura, se procedió a calentar previamente un aceite de oliva a la temperatura de 180°C en freidora profunda provista con termostato y termómetro, adiciando los trozos de carne de forma que no descendiera la temperatura del aceite por debajo de 170°C y regulando el ritmo de adición.

10.

La carne se mantenía en la freidora 90 segundos, con lo que se alcanzaba un agradable y homogéneo grado de fritura, teniendo en cuenta que las dimensiones de los trozos de carne a freír eran de 2 x 2 x 2 cm. y la proporción de aceite con la carne añadida era muy abundante.

15.

3) Degustación.— Los trozos fritos se reparten en platos numerados (cuya clave de distribución desconoce el degustador), de forma que un plato contenga un tipo de carne (tratado o testigo) en número no menor de 5 trozos homogéneos.

20.

A cada degustador se le entregan 10 platos tomados al azar del conjunto de platos, y debe calificar — por masticación la textura de la carne de cada uno como "blanda" o "dura", seleccionando el mismo orden de prueba o secuencia. (Prueba totalmente ciega).

25.

Quando las calificaciones de "blandas" coinciden con tratados y las de "duras" con testigos, entre un 60%—70% del conjunto de ellas dadas por el total de los degustadores de una prueba (normalmente 10 personas), el tratamiento enzimático se define como de "acción ablanda-

30.

POOR
QUALITY

5. dora positiva"; si coinciden entre un 70% < 80%, el tratamiento se considera como de "acción ablandadora positiva claramente significativa"; entre un 80% < 90% como "acción ablandadora positiva altamente significativa", y entre un 90% < 100% como "acción ablandadora positiva absolutamente significativa".

10. Se debe puntualizar que la acción ablandadora positiva depende de la clase de cocinado a que se someta la carne tratada. Así, en el caso de cocinado por ección, el grado de ablandamiento será mayor que el alcanzado por fritura o asado de una carne sometida al mismo tratamiento enzimático, por lo que un tratamiento calificado simplemente con "acción ablandadora positiva" en prueba de fritura, ordinariamente será adecuado para 15. tratar carnes que hayan de consumirse cocidas.

EJEMPLO 1

Ablandamiento de pierna de oveja por inyección de solución de proteasa de Streptomyces fradiae.

20. - Preparación de la solución enzimática:
Treinta gramos de proteasa de Streptomyces fradiae (Activ. = 12.500 UA/mg) se disuelven con agitación mecánica, durante media hora, en 1000 cc. de solución salina isotónica (8 gr. de ClNa/l.), y se filtra a vacío sobre torta de supercel para obtener una solución transparente con una actividad unitaria de 300.000 UA/ml y un pH de 6,1.
25. - Adición y condiciones de actuación del enzima:
Con el tenedor del equipo bomba para inyectar a presión, provisto de 3 agujas perforadas en la punta y en los laterales a una distancia
- 30.

5. fija y determinada, se procedió a la inyección de la solución de proteasa en la pierna de oveja a tratar, previamente pesada, haciéndolo homogéneo y lentamente para obtener un adecuado reparto del líquido inyectado dentro de la estructura proteica.

10. Terminada la adición de enzima, se vuelve a pesar la pierna tratada, comprobando que la cantidad de solución de proteasa inyectada y retenida por la pierna fue 100 ml por Kg. de pierna de oveja (30 millones de UA/Kg). Con la pierna testigo se procedió de igual forma, pero inyectando solamente solución isotónica salina.

15. Inmediatamente después de la adición del enzima, se introducen ambas piernas, tratada y testigo, en nevera (0-5°C), manteniéndolas durante 48 horas.

- Cocinado:

20. Transcurrido el tiempo fijado para actuación del enzima, se trocean ambas piernas en trozos homogéneos de una dimensión aproximada de 2 x 2 x 2 cm. y se procede al cocinado, que se realiza acando los trozos pñchados en una varilla de metal que giraba sobre la fuente de calor.

25.

- Resultados:

30. En estas condiciones se obtuvo una lisis total de la proteina, que se manifestó en una licuación de los tratados al ser expuestos al calor, frente a los testigos que conservaban su estructura proteica.

No se realizo, por innecesaria, la prueba de catadura.

EJEMPLO 2

Ablandamiento de pierna de oveja por inyección de solución de enzimas de Streptomyces fradiae.

5.

Tanto en la preparación de la solución enzimática como en la adición y condiciones de actuación del enzimá, se procedió de la misma forma indicada en el ejemplo 1.

10.

- Cocinado:

Terminado el tiempo de actuación del enzima (48 horas), se sometieron ambas piernas — (tratada y testigo) enteras y sin deshuesar al cocinado, introduciéndolas en horno a 160-165° C, en bandejas separadas, rociándolas con aceite de oliva durante una hora.

15.

- Resultados:

Igual que en el ejemplo 1, se obtuvo una lisis total, con desprendimiento de toda la estructura proteica del hueso, en el caso de la pierna tratada, frente a la pierna testigo.

20.

No se realizo, por ser innecesaria, la prueba de degustación.

25.

EJEMPLO 3

Ablandamiento de pierna de oveja por inyección de solución de proteasa de Streptomyces fradiae.

- Preparación de la solución enzimática:

Se disuelven 3 gr. de proteasa de Streptomyces fradiae (12.500 UA/ml) en 1 litro de solución salina isotónica (8 gr. de ClNa/l.)

30.

con agitación mecánica durante 30 minutos, y se filtra a vacío a través de torta de supercel, resultando una solución transparente con una actividad de 31.000 UA/ml y pH = 6,3.

5. - Adición del enzima:
Se realiza por inyección de la solución enzimática, en la misma forma indicada en el ejemplo 1.
La cantidad inyectada en este caso fue de -
10. 65 ml. de solución por Kg. de pierna de oveja (unos 2 millones de UA/Kg.)
- Temperatura y tiempo de acción:
Las piernas tratada y testigo, después de ser inyectadas, se introducen en nevera -
15. (0-5^o C) manteniéndolas durante 24 horas.
- Cocinado:
Terminado el tiempo en nevera, se trocean las piernas testigo y tratada en pedazos de - -
2 x 2 x 2 cm. y se procede a la fritura y -
20. posterior degustación, tal como se indica en la "Metodología general".
- Resultados:
El tratamiento enzimático puede considerarse como de "acción ablandadora positiva", ya que
25. el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados enzimáticos en un 60% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

EJEMPLO 4

30. Ablandamiento de pierna de oveja por inyección de solución de *Streptomyces fradiae*.

5. Tanto en la preparación de la solución enzimática, como en adición a las piernas testigo y tratado, se procedió de igual forma que en el ejemplo 3, empleando la misma cantidad (65 ml de solución / Kg de perna, 2 - millones de UA/Kg) de solución de proteasa.

Inyectadas ambas piernas con las correspondientes soluciones, se introducen en nevera (0-5° C) durante 48 horas.

10. La fritura y degustación siguió las normas indicadas en la "Metodología general".

- Resultados:

15. El tratamiento enzimático puede considerarse como de "acción ablandadora positiva claramente significativa", ya que el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados enzimáticos en un 70% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

EJEMPLO 5

20. Ablandamiento de carne de contra de vaca por inyección de solución proteasa de Streptomyces fradiae.

25. La solución enzimática se prepara disolviendo 15 gr. de proteasa de Streptomyces fradiae (actividad = 12.500 UA/mg en un litro de solución salina isotónica (8 gr. de ClNa/l.), con agitación mecánica durante media hora y posterior filtración al vacío sobre torta de supercel.

Así se obtiene una solución transparente de color pardo amarillento, con pH = 6,3 que valorada por el método Anson dió una actividad de 135.000 UA/ml.

30. La adición a la contra de vaca a tratar se efectúa con el tenedor del equipo bomba para inyectar a pre-

sión, en la misma forma que se indica en el ejemplo 1, y la contra de vaca testigo se inyecta análogamente, pero solo con solución salina isotónica.

5. La cantidad de solución inyectada fué de 50 cc. para el kilo de contra, correspondiente a 6,75 millones de UA/Kg. en la solución enzimática.

Las contras tratada y testigo, se mantienen a temperatura ambiente (20° C), en bandejas cubiertas, - durante 24 horas.

10. Transcurrido el tiempo de acción del enzima, - se procede a la fritura de las dos contras, tal como se indica en la "Metodología general", previamente troceadas en pedazos homogéneos de aproximadamente 2 x 2 x 2 cm.

- Resultados:

15. En estas condiciones, se obtuvo una lisis - total de la proteína, que se manifestó en - una licuación de los tratados durante la fritura, mientras que los testigos conservaban su estructura proteica. No se realizó, por innecesaria, la prueba de degustación.
- 20.

EJEMPLO 5

Ablandamiento de carne de contra de vaca por - inyección de solución de proteasa de Streptomyces fradiae.

25. Se procedió, de igual forma que en el ejemplo 5, en la preparación de solución enzimática y en la adición del enzima a la carne, inyectando la misma cantidad de solución (50 cc/Kg.)

30. Una vez inyectadas, las contras tratada y testigo se introducen en nevera y se mantienen 24 horas, procediendo seguidamente a su fritura y degustación, - tal como se indica en la "Metodología general"

- Resultados:

5. El tratamiento enzimático puede considerarse como de "acción ablandadora positiva altamente significativa" ya que el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados enzimáticos en un 85% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

EJEMPLO 7

10. Ablandamiento de carne de contra de vaca por inyección de solución de proteasa de Streptomyces fradiae.

Se procedió exactamente igual que en el ejemplo 5, pero variando las condiciones de temperatura y tiempo de acción del enzima, que en este caso fueron de 0-5° C (nevera) durante 48 horas.

15. - Resultados:

El tratamiento enzimático puede considerarse como de "acción ablandadora positiva claramente significativa", ya que el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados enzimáticos en un 75% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

20.

EJEMPLO 8

25. Ablandamiento de carne de contra de vaca por espolvoreo con mezclas sólidas conteniendo proteasa de Streptomyces fradiae.

- Preparación de la mezcla:

30. Se mezclan homogéneamente 10 gr. de proteasa de Streptomyces fradiae (Activ. = 12.500 UA/mg) con 90 gr. de glutamato sódico, para obtener 100 gr. de una mezcla activa conteniendo el enzima proteolítico con una actividad de 1.250

UA/mg.

- Adición de la mezcla a la carne de contra de vaca:

5. Seleccionadas dos contras pares de vaca, para que actúe una de testigo y en la otra se realice el tratamiento enzimático, se cortan en trozos similares de una dimensión aproximada de 2 x 2 x 2 cm.
10. Los trozos a tratar se espolvorean con la mezcla activa en proporción de 27,6 gr. de mezcla (34,5 millones de UA) por kilo de carne, homogeneizando seguidamente para obtener un buen reparto del enzima en la superficie de los trozos de carne.
15. Con la contra testigo se procede de igual forma, espolvoreando con la misma cantidad (27,6 gr/Kg de carne), pero solamente de glutamato sódico.
20. Finalizada la adición del enzima, se introducen ambas contras (testigo y tratada) en nevera (0-5° C) manteniéndolas durante 16 horas, tiempo fijado en esta prueba para que el enzima ejerza su acción.
25. Transcurrido este tiempo, se procede a la fritura y degustación de las dos contras, tal como se indica en la "Metodología general".
- Resultados:
30. El tratamiento enzimático puede considerarse como de "acción ablandadora positiva absolutamente significativa", ya que el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados

enzimáticos en un 100% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

EJEMPLO 9

5. Ablandamiento de carne de contra de vaca por espolvoreo con mezclas sólidas conteniendo proteasa de *Streptomyces fradiae*.

10. Se mezclan homogéneamente 10 gr. de proteasa de *Streptomyces fradiae* (Activ. = 12.500 UA/mg) con 30 gr. de cloruro sódico, 30 gr. de fosfato bicálcico y 30 gr. de fosfato bisódico, para obtener 100 gr. de una mezcla activa de proteasa de *Streptomyces fradiae* con una actividad de 1.250 UA/mg.

15. La adición del enzima se realiza de igual forma que en el ejemplo 8, pero la cantidad de mezcla añadida en este caso fué de 18 gr. (22,5 millones de UA) por kilo de carne a tratar.

20. Las dos contras, tratada y testigo, se mantienen a temperatura ambiente (20° C) durante 3 horas, procediendo seguidamente a la fritura y degustación, tal como se indica en la "Metodología general".

- Resultados:

25. El tratamiento enzimático, puede considerarse como de "acción ablandadora positiva absolutamente significativa", ya que el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados enzimáticos en un 100% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

EJEMPLO 10

30. Ablandamiento de carne de contra de vaca por espolvoreo con mezclas sólidas conteniendo proteasa de

Streptomyces fradiae.

5. La preparación y adición de la mezcla a la contra de vaca se realizó de igual forma que en el ejemplo 9, pero la cantidad de mezcla añadida fué de 6 gr. (7,5 millones de UA) por kilo de carne a tratar, mientras que la temperatura y tiempo de actuación del enzima se mantuvieron análogamente al ejemplo anterior, es decir, 3 horas a temperatura ambiente.

10. La fritura y degustación se efectuó según se indica en la "Metodología general".

- Resultados:

15. El tratamiento enzimático puede considerarse como de "acción ablandadora positiva altamente significativa", ya que el equipo degustador apreció ablandamiento de los tratados enzimáticos en un 80% de la muestra presentada en la prueba doble ciega de degustación.

NOTA

Descrito suficientemente el objeto de la presente Patente de Invención, 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:

- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- 14.- Procedimiento para el ablandamiento de estructuras proteicas, rígidas o semirígidas, caracterizado por basarse en la utilización de enzimas obtenidos por fermentación de microorganismos y más concretamente, separados de cultivos de "streptomyces fredise", enzimas que, en estado sólido o en la solución resultante de su mezcla con otros productos potenciadores adecuados, se adicionan a la estructura proteica a ablandar, en cantidades que vendrán determinadas por la actividad unitaria de tales enzimas, por su especificidad para el sustrato proteico de que se trate, por el pH y tiempo de acción, por la temperatura a que se dejen actuar y por el método que se emplee para su adición al sustrato proteico, así como por la propia constitución de éste, por su grado de dureza y por el ablandamiento que se desee obtener con el tratamiento.
 - 26.- Procedimiento para el ablandamiento de estructuras proteicas, rígidas o semirígidas, según la reivindicación 14, caracterizado, además, por que la adición del enzima al sustrato proteico puede realizarse mediante espolvoreo, impregnación, multi-inyección dosificada, mezcla con los triturados proteicos debidamente amasados o, en el caso de animales vivos para carne, inyección previa al sacrificio, de manera que el riego sanguíneo reparta el enzima inyectado por los paquetes musculares que se -

deseen ablandar.

3ª.- Procedimiento para el ablandamiento de estructuras proteicas, rígidas o semirígidas.

Todo según se describe y reivindica en la presente Memoria descriptiva que consta de dieciocho hojas debidamente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras y en las adjuntas tablas y gráficos.

Madrid, 27 de septiembre de 1.977

EL AGENTE:

P. D.

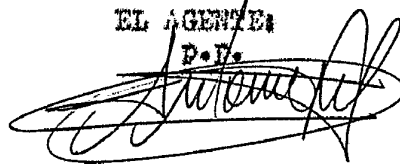


TABLA 1
 ESTABILIDAD DE PROTEASA DE STREPTOMYCES FRADIAE EN
 ESTADO SOLIDO A 100° C

<u>TIEMPO</u>	<u>UA/mg</u>	<u>% ACTIVIDAD INICIAL</u>
0	8.532	100,0 %
15 min.	8.406	98,5 %
30 min.	8.029	94,1 %
45 min.	8.139	95,3 %
60 min.	8.411	98,5 %
2 Horas	7.436	87,1 %
3 Horas	7.684	90,0 %
22 horas	6.955	81,5 %

TABLA 2

ESTABILIDAD DE SOLUCION DE PROTEASA DE S. FRADIAE A
 pH = 6,0 Y TEMPERATURA = 0 - 5° C

<u>TIEMPO</u> <u>(Dias)</u>	<u>UA/ml</u>	<u>% ACTIVIDAD</u> <u>INICIAL</u>
0	110.348 ± 4.876	100,0 %
7	76.012 ± 6.175	68,9 %
62	27.270 ± 2.307	24,7 %

TABLA 3

ESTABILIDAD DE SOLUCION DE PROTEASA DE S. PRADIAE A
 pH = 6,0 Y TEMPERATURA AMBIENTE

<u>TIEMPO (Dias)</u>	<u>UA/ml</u>	<u>% ACTIVIDAD INICIAL</u>
0	110.348 ± 4.876	100,0 %
9	50.619 ± 2.248	46,0 %
13	36.028 ± 1.981	33,0 %
69	21.918 ± 1.465	20,0 %

TABLA 4

ESTABILIDAD DE SOLUCION DE PROTEASA DE S. PRADIAE A
 pH = 6,0 Y TEMPERATURA = 37^o C

<u>TIEMPO</u> <u>(Dias)</u>	<u>UA/ml</u>	<u>% ACTIVIDAD</u> <u>INICIAL</u>
0	110.348 ± 4.876	100 %
3	20.883 ± 1.328	19 %
5	11.445 ± 1.154	10 %

CABLA 5

ESTABILIDAD DE SOLUCION DE PROTEASA DE STREPTOCOCCOS PRADIAE CON Ca⁺⁺ A TEMPERATURA AMBIENTE Y DIFERENTE PH

PH	0 DIA		1 DIA		2 DIAS		3 DIAS		4 DIAS		7 DIAS	
	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL
2,9	16.969	33,9	11.281	22,5	8.223	16,4						
3,8	29.183	58,2	18.482	36,9	16.785	33,5						
4,6	41.763	83,3	31.524	62,9	27.167	54,2						
5,6	43.865	86,5	37.144	73,3	35.679	70,4	33.820	65,2	30.698	60,5		
6,0	44.110	87,0	40.924	80,7	37.680	74,3	34.329	66,7	33.329	65,7		
6,2	44.613	88,0	42.379	83,6	37.413	73,8	34.078	67,7	33.946	66,9		
7,6	45.144	89,0	39.855	78,6	40.882	80,6	-	-	35.519	70,1	35.519	67,4
8,2	46.211	91,1	41.463	81,8	42.688	84,2	-	-	38.648	76,2	37.181	73,3
8,8	45.472	89,7	38.871	76,7	40.341	79,6	-	-	35.604	70,2	33.158	65,4
9,2	44.323	87,4	37.710	74,4	37.814	74,6	-	-	32.686	64,5	28.810	56,8

NOTA: Se considera como actividad inicial el valor teórico de las soluciones (50.712 UA/ml).

Las pérdidas de actividad del día 0, serán debidas al ajuste de pH y filtrado de las soluciones iniciales durante el proceso de manipulación (2horas).

TABLA 5

ESTABILIDAD DE SOLUCION DE PROTEASA DE STREPTOCYCES FRADIAE CON

pH	0 DIA		1 DIA		2 DIAS	
	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% AC INIC
2,9	16.969	33,9	11.281	22,5	8.223	16,
3,8	29.183	58,2	18.482	36,9	16.785	33,
4,6	41.763	83,3	31.524	62,9	27.167	54,
5,6	43.865	86,5	37.144	73,3	35.679	70,
6,0	44.110	87,0	40.924	80,7	37.680	74,
6,2	44.613	88,0	42.379	83,6	37.413	73,
7,6	45.144	89,0	39.855	78,6	40.882	80,
8,2	46.211	91,1	41.463	81,8	42.688	84,
8,8	45.472	89,7	38.871	76,7	40.341	79,
9,2	44.323	87,4	37.710	74,4	37.814	74,

NOTA: Se considera como actividad inicial el valor teórico de la solu
 Las pérdidas de actividad del día 0, serán debidas al ajuste de p
 proceso de manipulación (2horas).

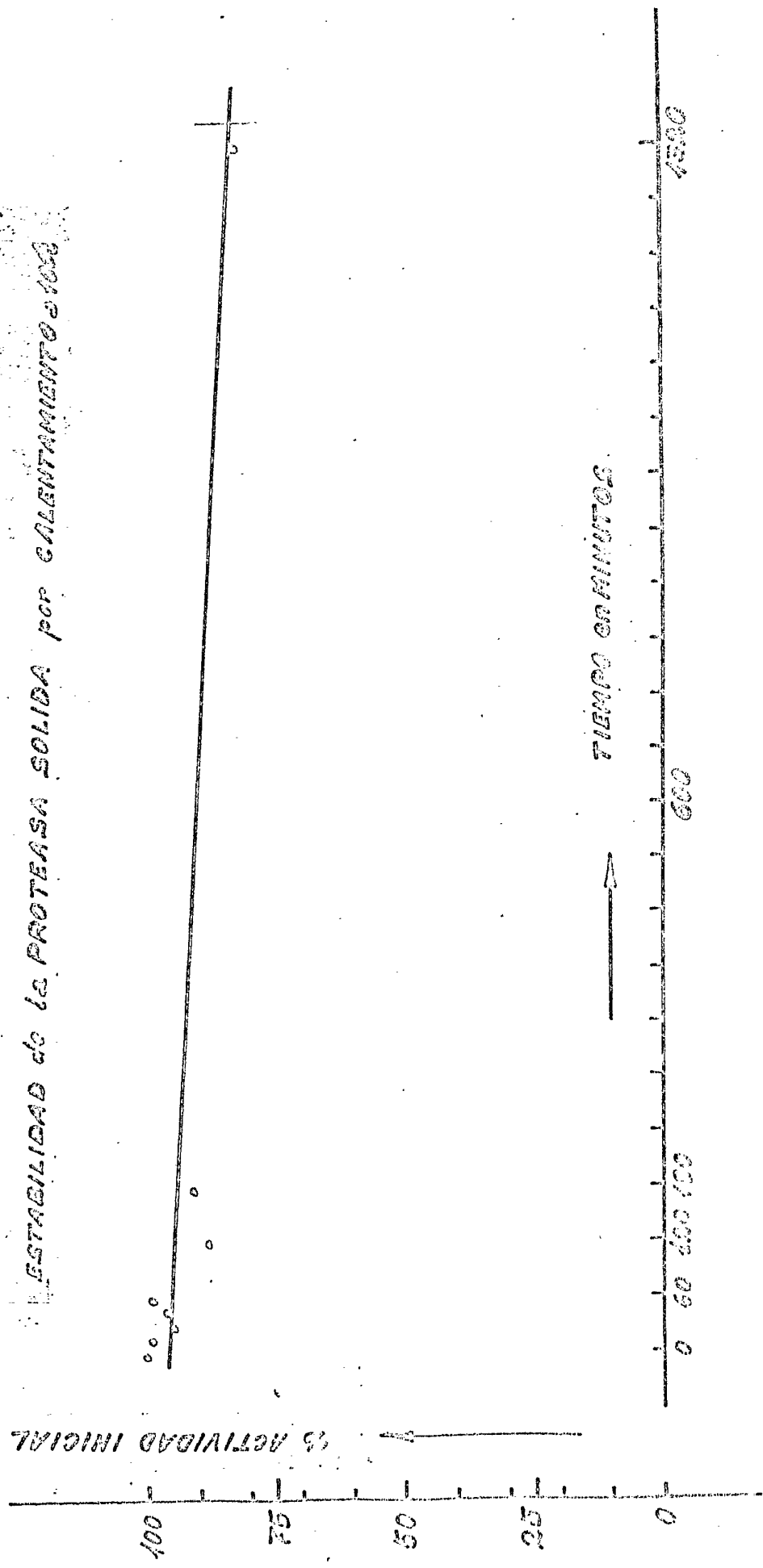
CON Ca⁺⁺ A TEMPERATURA AMBIENTE Y DIFERENTE pH

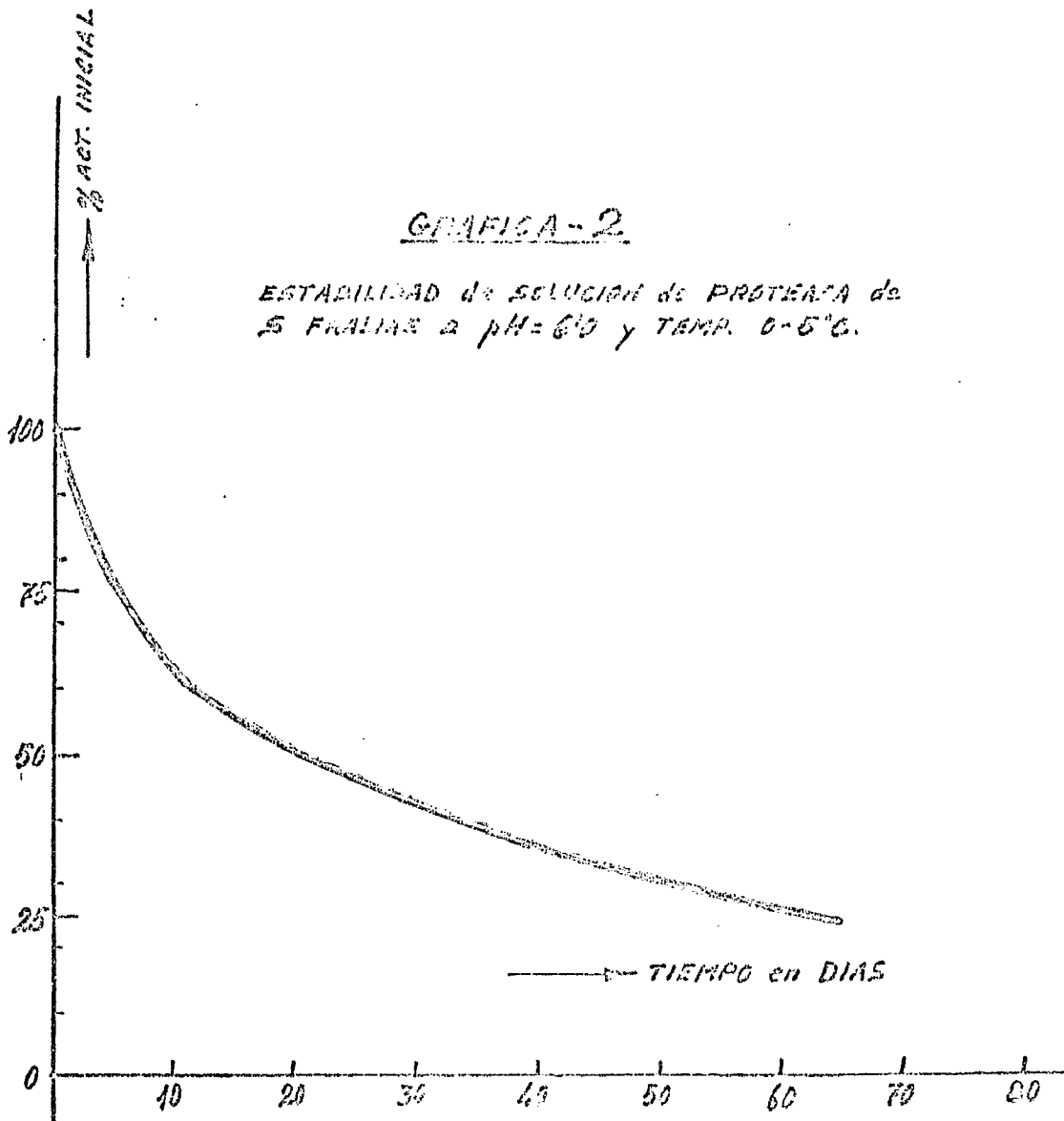
% ACTIV. INICIAL	3 DIAS		4 DIAS		7 DIAS	
	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL	UA/ml	% ACTIV. INICIAL
16,4						
33,5						
54,2						
70,4	33.820	65,2	30.698	60,5		
74,3	34.329	66,7	33.329	65,7		
73,8	34.078	67,7	33.946	66,9		
80,6	-	-	35.519	70,1	35.519	67,4
84,2	-	-	38.648	76,2	37.181	73,3
79,6	-	-	35.604	70,2	33.158	65,4
74,6	-	-	32.686	64,5	28.810	56,8

soluciones (50.712 UA/ml).

de pH y filtrado de las soluciones iniciales durante el

GRAFICA - 1
ESTABILIDAD de la PROTEASA SOLIDA por CALENTAMIENTO a 100°C

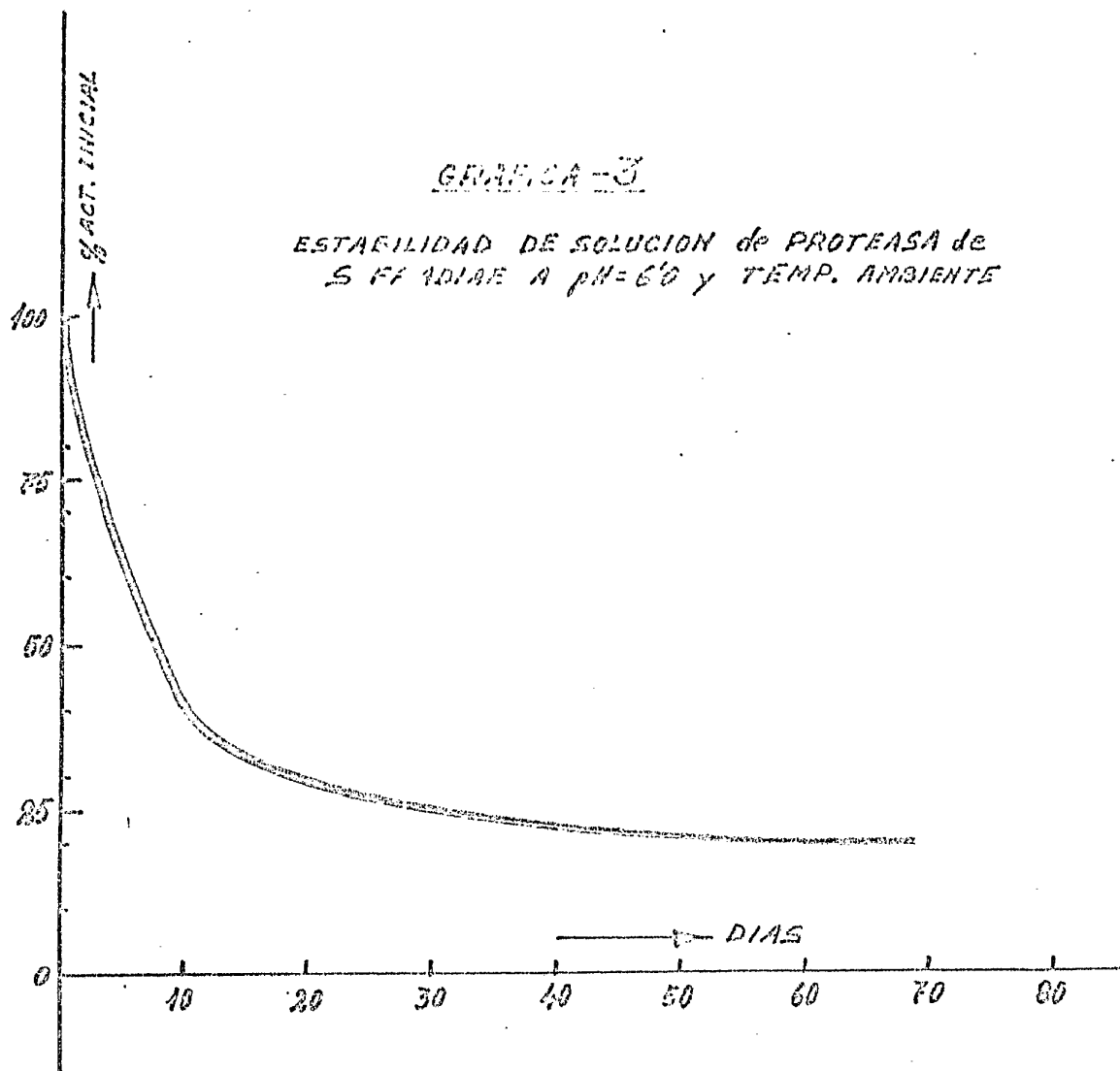




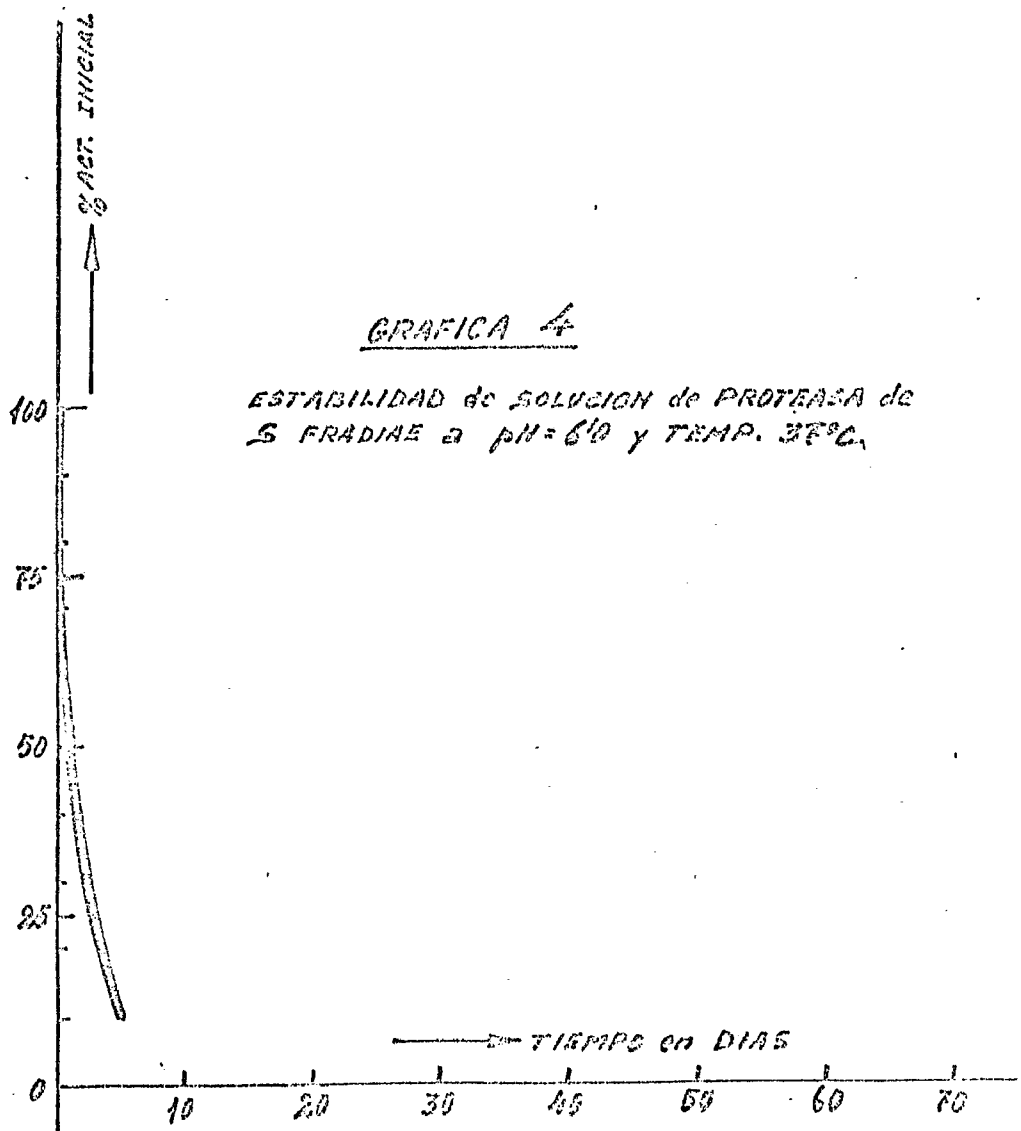
**POOR
QUALITY**

GRAFICA-3

ESTABILIDAD DE SOLUCION de PROTEASA de
S. FF. 101AE A pH=6.0 y TEMP. AMBIENTE



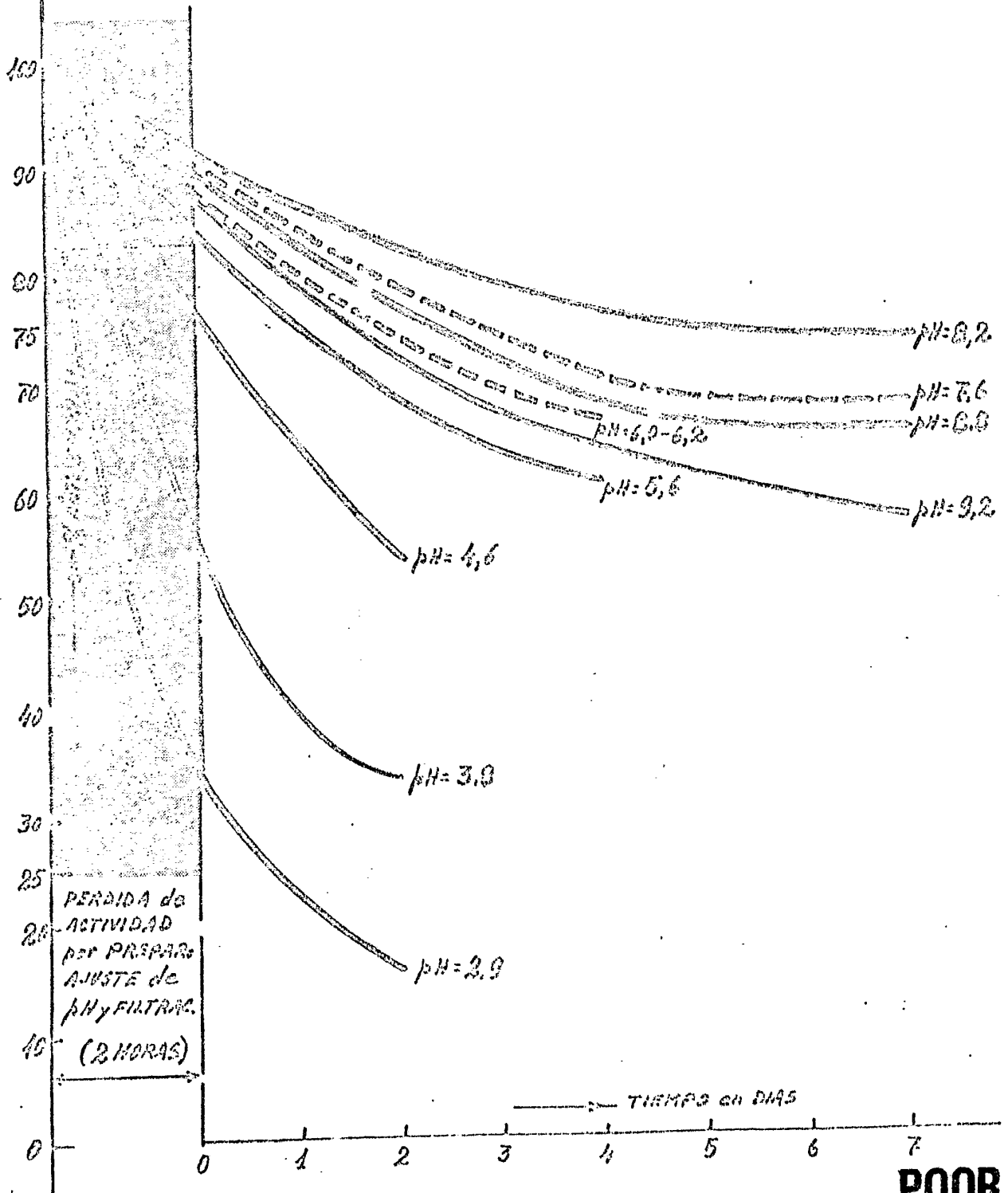
POPE
QUALITY



**POOR
QUALITY**

GRAFICA 5

ESTABILIDAD de SOLUCIONES de PROTEASA
con Ca^{++} a TEMPERATURA AMBIENTE y DIFERENTES pH



PERDIDA de
ACTIVIDAD
POR PREPARAR
AJUSTE de
pH y FILTRAC.
(2 HORAS)

TIEMPO en DIAS

**POOR
QUALITY**