



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO 477038	10 A1
21	22 FECHA DE PRESENTACION 22 ENE. 1979	

**PATENTE DE INVENCION**

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
P 28 13 075,8	25.3.1978	ALEMANIA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C08L; C09H	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
54 TITULO DE LA INVENCION "Procedimiento de preparación de primeras materias conteniendo colágeno, destinadas a la fabricación de gelatina, cola, así como de hojas e hilos de colágeno"		
71 SOLICITANTE (S) RÜHM GmbH (sociedad alemana)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE D-6100 DARMSTADT 1 (Alemania Fed.) Kirchhainallee		
72 INVENTOR (ES) 1.- Dr. Alexander BERG 2.- Zdenek ECKMAYER 3.- Dr. Rolf MONSHEIMER (todas nac. alemana) 4.- Ernst PFLEIDERER		
73 TITULAR (ES) * * * * *		
74 REPRESENTANTE Dr. Carlos Raab Ungehauser		

**POOR  
QUALITY**

1 Las primeras materias conteniendo colágeno sirven en la técnica como base para la fabricación de diferentes productos finales, que tienen como condición previa que el colágeno no se desintegre esencialmente más allá de una masa de moléculas de  $1 \times 10^4$ . Son ejemplos para tales productos finales, preparados técnicamente, gelatina, cola, hilos y hojas de colágeno (comparase G. Reich en la monografía "Kollagen" páginas 256 hasta 262, Verlag Steinkopff, Dresden, 1.966).  
5 El método de la obtención de los arriba citados productos técnicos a partir del colágeno se explicará en el ejemplo de la gelatina.  
10

La sustancia de partida para la preparación de gelatina es, como es sabido el colágeno, una proteína de fibras, que está contenida en huesos y en el tejido conjuntivo de los animales y forma la sustancia estructural de la piel de cuero, de numerosas membranas internas, de los tendones, de los cartílagos y de las escamas del pescado. La estructura del colágeno es ampliamente conocida. Técnicamente se fabrica la gelatina predominantemente a partir de huesos y de piel (gelatina de huesos, respectivamente de piel).  
15

Como primera materia para la obtención de gelatina sirven principalmente los productos residuales y secundarios de las fábricas de curtidos, de la industria elaboradora del cuero de los mataderos y de las carnicerías. Para la preparación de gelatina de piel se utiliza, por ejemplo, cabezas de terneras y de ganado vacuno, así como recortes de flancos y patas, que se suministran recientemente calcificados o salados, además, cuero de cola de disociación en estado calcificado, secado o salado, además las pieles de cerdos jóvenes  
20  
25  
30

1 de matadero y semejantes. Para la fabricación de gelatina de huesos entran en consideración como primera materia, huesos troceados, huesos de piel, residuos de establecimientos para el torneado de huesos, huesos de cabeza seleccionados, homóplatos, etc.

5 En la transformación a los productos finales deseados como gelatinas, cola, hilos y hojas de colágeno, la estructura del colágeno se conserva parcialmente. Los procesos técnicos para la obtención de los mencionados productos tienen que tener en cuenta esta condición previa.

10 Desde la resolución, respectivamente desde el tratamiento previo del material crudo, pueden diferenciarse dos tipos de gelatina: Gelatinas cineradas alcalinamente y gelatinas cineradas de modo ácido. Las gelatinas cineradas acidamente que se preparan principalmente a partir de la piel de cerdos jóvenes quedan fuera de consideración para el presente invento.

15 El tratamiento con álcali (la calcificación) ocasiona una transformación química del colágeno (madurez de decocción) de modo que más tarde al decocer se disuelva con agua caliente. La fabricación de gelatina comprende, por lo tanto, una serie de fases de trabajo. En la utilización de huesos como primeras materias se encuentra al principio la limpieza, el desengrasado y la trituración.

20 Después se disuelve el fosfato de tricalcio incluido en el tejido del hueso por tratamiento, que dura de ocho a catorce días con ácido diluido (se macera), se lava el material del hueso (ossina) y se cinera seguidamente con una solución de 5 a 15% de hidróxido cálcico durante un periodo de tres

25

30

1 a 16 semanas. Después de terminada la cineración los huesos se limpian y neutralizan en instalaciones lavadoras mecánicas desprendiéndose la cal adherida. Este lavado y limpieza de la primera materia procedente de la cineración requiere grandes cantidades de agua.

5 Del colágeno de huesos lavado en forma neutra, después con agua, se extrae la gelatina como solución coloidal a temperaturas entre 40 y 90°C en varios "extractos".

10 Al utilizar piel como primera materia se procede análogamente al caso de los huesos. El material nativo de piel, primeramente con adición de lechada de cal (para iniciar el proceso de hinchazón) se libera de la sal conservadora. Entonces -hasta el aflajamiento perfecto de la pilosidad- durante el

15 rededor de tres semanas se trata con lechada de cal de 6 a 7% Be. Seguidamente se eliminan los pelos, el material de piel se tritura y renovadamente se cinera durante 12 - 15 semanas con lechada de cal. Entonces el colágeno de piel, tal como se describe en la gelatina de huesos, se sigue elaborando.

20 La botención de la gelatina de recortes de piel sigue el procedimiento empleado para el material nativo de piel. Las pieles se trituran y seguidamente se cineran durante 8 - 14 semanas. La elaboración ulterior transcurre como en el caso de la gelatina de huesos.

25 El contenido de colágeno de las primeras materias tratadas en cada caso se conoce en general.

30 Está claro que el grado de disociación del colágeno y relacionado con ello y la calidad del producto de disociación depende de la resolución y de la hidrólisis térmica. En -

1 solución acuosa, por ejemplo, las moléculas de gelatina están  
presentes con masas moleculares relativas desde alrededor  
de 4.000 hasta alrededor de  $4 \times 10^6$ . En la práctica se cuen-  
ta con masas moleculares de alrededor de 11.000 hasta 100.000  
para gelatina.

5 Las diferentes medidas, especialmente la cineración del ma-  
terial conteniendo colágeno requieren tiempos de una prolonga-  
ción fuera de toda relación y no han palpado intentos de  
abreviar la cineración y en lo posible mejorar la calidad de  
los productos como gelatina.

10 En las patentes de EE.UU. no 2.741.575 y 1.741.576 se indi-  
ca la utilización de microorganismos como Saccharomyces, My-  
coderma o Torulopsis para conseguir la madurez de decocción  
de primeras materias de cola, respectivamente de gelatina  
de piel.

15 En la memoria de patente soviética 151.745 para la acelera-  
ción de la cineración de residuos de cuero se recomienda un  
extracto de enzimas de Aspergillus flavus y adicionalmente  
de pancreatina. En la Memoria de patente japonesa 70 06 274  
20 se recomienda el tratamiento del material conteniendo colá-  
geno con ~~prteases~~ proteasas ácidas con un pH ácido para la preparación  
de gelatina. Como ejemplo se indica la incubación de un cuero  
de ternera pH de 2,9 con Proctase a A. niger var. macrospe-  
rus durante 48 horas.

25 Una posibilidad para la preparación de gelatina consiste  
según el Bull. Soc. Sci., Photogr. Jap. No. 16, 30 (1.966)  
en que se transforman fibras de colágeno mediante enzimas pro-  
teolíticas en moléculas monómeras de colágenos solubles.

30 Se recomienda una enzima con amplia especificidad, por ejemplo

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

la p<sup>ro</sup>nasa en presencia de cloruro calcico. Segun la memo-  
ria expositiva de patente alemana 26 29 594 se utiliza con  
ventaja para el "acondicionamiento alcalino o neutro" de co-  
lageno para la extraccion de gelatina, la solucion de una  
enzima proteolitica neutra o alcalina a un valor de pH entre  
7 y 13 en el plano de cuatro a 72 horas a temperaturas de  
20 hasta 40°C. Se mencionan especificamente tripsina, prote-  
asas Bacillus y las alcalasas descritas en la patente bri-  
tanica n<sup>o</sup> 1.234.784.

Se ha encontrado que sorprendentemente la duracion del pro-  
cedimiento para la resolucion del colageno, tal como esta  
presente en el material de hueso despues de la maceracion  
y en las primeras materias en base de tejidos de piel, res-  
pectivamente conjuntivos, eventualmente despues de la elimi-  
nacion de la sal de conservacion, de los pelos, etc., hasta  
la "madurez de cocci<sup>o</sup>n" pueda reducirse a una fraccion del  
tiempo necesario segun los procedimientos del estado de la  
tecnica, si las primeras materias conteniendo el colageno  
mencionadas se incuban con proteasas neutras y/o alcalinas  
en una solucion con un valor pH entre 6,5 y 13 a una tempe-  
ratura entre 18 y 40°C en presencia de urea y/o guanidina,  
y/o sus sales de adici<sup>o</sup>n de acido.

Como primera materia para el procedimiento de preparacion  
segun el invento de colageno segun ello entran en considera-  
cion los materiales conocidos por ejemplo, los mencionados  
en lo que precede, en base de huesos y de pieles, respecti-  
vamente de pellejos. Especialmente deben mencionarse como  
substratos del procedimiento segun el invento la caseina asi  
como las pieles que se suministran recién calcificadas o sa-

1 ladas así como disociación en estado calcificado, desdado  
o salado despues de la ejecución de la medida usual, que pre  
cede a la incineración.

5 Entre las proteasas neutras y/o alcalinas, que deben utili  
zarse según el invento deben entenderse, tanto las enzimas  
obtenidas de microorganismos, como aquellas obtenidas de  
organismos superiores. Deben mencionarse especialmente las  
proteasas neutras y/o alcalinas de procedencia bacteriana  
por ejemplo, las proteasas aisladas a partir de cepas de *Ba*  
10 *cillus*. Deben mencionarse, por ejemplo, las proteasas neutras  
y/o alcalinas de *B. Licheniformis*, *B. firmus*, *B. pumilus*,  
*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. alcalophilus*, *B. subtilis*, *B.*  
*parviticus*, así como la proteínasa neutra de bacterias pro  
cedentes de *Streptomyces griseus*. Deben mencionarse además  
15 las proteasas de hongos neutras y/o alcalinas, por ejemplo,  
aquellas de las clases *Aspergillus*, como *A. oryzae*, *A. so*  
*jae*, *A. flavus*, además *Paec. varioti*, *Rhiz. chinensis*, *Mu*  
*cor pusillus*, así como proteasas vegetales, como papaina,  
bromelaina y ficina, igualmente las proteasas de páncreas  
20 así como combinaciones de las enzimas mencionadas. La deno  
minación de proteasas "neutras" respectivamente "alcalinas"  
se refiere al alcance relativo de pH (*Ullmanns Enzyklopadie*,  
*der Techn. Chemie*, Hrag. E. Bartholome y otros, volumen 10,  
páginas 517 hasta 522, *Verlag Chemie Weinheim*, 1.975), Bajo  
25 el término de proteasas neutras deben entenderse aquellas  
de un alcance de actividad de pH entre 5,5 y 7,5 y bajo el  
término de proteasas alcalinas se entienden aquellas con un  
alcance de actividad de pH entre 7 y 12.

30 Debe entenderse en el procedimiento según el presente invento

1 al a justa de un valor pH cercano al grado optimo de acti-  
2 vidad de la o las enzimas utilizadas respectivamente. Even-  
3 tualmente tambien la temperatura tiene que adaptarse a las  
4 condiciones de actividad de las enzimas elegidas. En gene-  
5 ral, las temperaturas de incubación están situadas entre 18  
6 y 40°C. Como valores orientativos para la concentración de  
7 las enzimas, que deben utilizarse según el invento, pueden  
8 considerarse de 1 a 10 especialmente de 2 a 5 unidades de  
9 Löhleim-Volhard (definido en lo que sigue como L.V.E.) por  
10 g. de colágeno, que esté contenido en la primera material.  
11 Adecuadamente los datos característicos conocidos se obser-  
12 varán para las distintas enzimas (grados optimos de tempe-  
13 ratura, condiciones de estabilidad) en tanto que sean to-  
14 lerables técnicamente.  
15 Debe considerarse como extraordinariamente sorprendente que  
16 en el procedimiento según el invento la madurez de cocción  
17 se fomenta por la utilización de proteasas neutras, respec-  
18 tivamente alcalinas, con adición de urea, de una manera téc-  
19 nicamente muy deseable. El alcance preferido está situado  
20 en el caso de adiciones de urea, el producto previo enzima-  
21 tico de 0,004 gramos hasta 0,04 gramos, preferentemente  
22 de 0,01 gramos hasta 0,03 gramos por gramo de colágeno en  
23 la primera materia seca conteniendo colágeno.  
24 Por lo demás, pueden aprovecharse las experiencias existen-  
25 tes en el estado de la técnica del procedimiento de cinera-  
26 ción en la ejecución del procedimiento según el invento.  
27 El procedimiento del presente invento permite reducir los  
28 tiempos de cineración (madurez de decocción) hasta alrede-  
29 dor de 4 a 24 horas. El progreso conseguido por ello es im-

portante.

El procedimiento enzimático de resolución para la obtención de gelatina según el presente invento pueda interrumpirse cuando se haya alcanzado la madurez de decocción. Para la definición de la madurez de decocción comparese la obra de Reich, loc. cit. página 244 mencionada, véase también el ejemplo 1. Seguidamente, de modo adecuado, las enzimas respectivamente se inactivan, por ejemplo, ajustando el grado ácido al material.

La ulterior preparación para obtener gelatina, cola, y fibras e hilos de colágeno puede ejecutarse de manera conocida.

En el procedimiento del presente invento pueden emplearse aditivos, conocidos en sí, a la reacción enzimática, como activadores, estabilizadores y semejantes. La eficacia proteolítica de enzimas usualmente se determina según el método de Anson-Hemoglobina (M.L. Anson J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939)) respectivamente según el método de Löhleln-Volhard (Die Löhleln-Volhard fache methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität Gerber-chem. Taschenbuch, Dresden-Leipzig 1.955) como "LVE" (unidad de Löhleln-Volhard). Bajo una unidad de Löhleln debe entenderse en gramos aquella cantidad de enzima que, bajo las condiciones específicas, del método digiere 1,725 mg. de caseína.

Los siguientes ejemplos explicarán el procedimiento según el invento, sin que la protección reivindicada deba limitarse precisamente a esta forma de ejecución.

Ejemplo 10

El material de partida para la preparación de decocción es pellejo de buey remojado con agua y cinsrado con cal y sulfato sódico. Un kg. de pellejo de buey se mezcla con 1,5 litros de agua a 40°C. La temperatura en baño de agua se mantiene a 40°C y sin movimiento se trata con

1 gramo de proteinada de bacterias alcalina de *Bacillus Licheniformis* 9.000 I.V.I.

4 gramos de urea.

20 gramos de hidrato de calcio.

durante cuatro horas a un pH de 10,0. Después de transcurrido este tiempo se había alcanzado la madurez de decocción, es decir, que los pellejos de buey podían atravesarse con el dedo y las fibras podían aislarse frotando entre los dedos.

El peso del pellejo se redujo a 635 gramos. Después de ello el material del pellejo primero se lavó varias veces con agua desalinizada. Para inhibir la acción de enzima se introdujo en una solución con

200% de agua desalinizada, 20°C

4 gramos de ácido sulfúrico al 98%

Se agitó varias veces revolviendo. El valor pH de la solución importó 3,0. Después de tres horas, el caldo de desecho. Después se lavó varias veces con agua desalinizada hasta que se había alcanzado un valor neutro de pH. Seguidamente se

fundió con 150% de agua desalinizada durante cuatro horas a 70°C. Se obtuvieron 150 gramos de material no derratido.

El rendimiento importó 85%. Después de ello, se separó por filtración. Para la desodorización se añadieron al filtrado

0,05 gramos de carbón activo. Después de separar por centi-

1 fugación, se filtró renovadamente. Después de ello en el evaporador de vacío se evaporó a 30°C. Las indicaciones en tantos por ciento precedentes y siguientes se refieren al peso respecto a la primera material elaborada conteniendo agua.

Ejemplo 2:

5 1,000 gramos de piezas de paja de vaca recién cineradas se pesaron dentro de un vaso de dos litros y se mezclaron con 1,5 litros de agua a 40°C. Para la preparación se añadieron:

10 2 gramos de proteínasa de bacterias de Bacillus Subtilis con 9.000 LVE.

8 gramos de urea

10 gramos de lejía sodica al 33%

15 El valor pH de la solución importó 11,5. Para mantener constantemente temperatura se trató en baño de agua durante 8 horas a 40°C. Después de este tiempo los pallejos estaban maduros para la decocción. El peso importó en este estado 300 gramos. El ulterior tratamiento se efectuó como se ha descrito en el ejemplo 1. Después de derretir no se obtuvo ningún residuo. Rendimiento completo.

20 Ejemplo 3:

25 1,000 gramos de trozos de cuero de buey cinerados se pesaron en un vaso de dos litros y se mezclaron con 1,5 litros de agua, a 40°C. La preparación se efectuó sin movimiento y para mantener una temperatura constante en el termostato a 40°C. La duración del tratamiento importó 10 horas. Para la preparación se añadieron:

30 1,5 gramos de proteínasa de bacterias de Bacillus firmus con 9.000 LVE.

1 6,0 gramos de urea.  
20,0 gramos de hidrato de calcio.  
El valor pH de la solución importó 10,2. El derretido, lavado y la inhibición de la actividad de enzimas se efectuaron análogamente al ejemplo 1. Después de derretir se obtuvo un  
5 residuo de 50 gramos de material no derretible. Rendimiento 90%.

Ejemplo 4.  
1.000 gramos de trozos de cuero de vaca cinerados se pesaron en un vaso y se mezclaron con 1,5 litros de agua a 40°C. La  
10 preparación se efectuó sin movimiento. A la solución se añadieron:

1,5 gramos de proteinasa de hongos de *Aspergillus parasiticus* con 9.000 LVE.  
6,0 gramos de hidrocloreuro de guanidina.  
15 20,0 gramos de hidrato de cal.

El valor pH de la solución importó 10,2  
El lavado, la inhibición de la actividad enzimática, el de-  
20 rretido se efectuaron análogamente al ejemplo 1. Después de derretir se obtuvo un residuo de 80 gramos de material no derretible. Rendimiento 80%.

La presente patente de invención recaerá sobre las siguientes reivindicaciones.  
25  
30

## REIVINDICACIONES

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

1.- Procedimiento de preparación de primeras materias conteniendo colágeno, destinadas a la fabricación de gelatina, coles, así como de hojas e hilos de colágeno, para la deformación, el hilado y el derretido de extracción del colágeno, preparado a partir de la primera material usual, utilizando proteasas neutras y/o alcalinas, caracterizado porque la mencionada primera materia conteniendo colágeno, después de la preparación previa usual, se incuba en una solución, que contiene las proteasas neutras y/o alcalinas a un pH entre 6,5 y 13 en presencia de urea y/o guanidina y sus sales de adición de ácido y seguidamente se inactivan las enzimas.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, especialmente para la cineración de primera materia conteniendo colágeno como ossina así como cueros en estado fresco, calcificado o salado y trozos de cuero en estado calcificado, secado o salado para la fabricación de gelatina, que se había preparado de manera usual para la cineración, utilizando proteasas neutras y/o alcalinas, caracterizado porque la mencionada primera materia, preparada previamente para la cineración, se incuba en una solución que contiene las proteasas neutras y/o alcalinas a un valor pH entre 6,5 y 13 en presencia de urea y/o guanidina y sus sales de adición de ácido y seguidamente se inactivan las enzimas.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque por gramo de colágeno se introducen 0,004 gramos hasta 0,04 gramos de urea, respectivamente de guanilina y/o la cantidad correspondiente de la sal de adición de ácido.

POOR  
QUALITY

1 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por la aplicación de la proteínasa alcalina de bacterias de *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus firmus* y/o proteínasa de hongos de *Aspergillus parasiticus*.

5 5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por la aplicación de proteasas neutras y/o alcalinas en una cantidad que corresponde de 1 a 10, especialmente de 2 a 5 IVE por gramo de colágeno en la primera materia.

10 6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por los tiempos de incubación, con proteasas neutras y/o alcalinas en presencia de urrea, respectivamente de guanidina, y/o sus sales de adición de ácido, importe de 4 a 24 horas.

15 7.- Procedimiento de preparación de primeras materias conteniendo colágeno, destinadas a la fabricación de gelatina, coles, así como de hojas e hilos de colágeno.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva. Consta de 13 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 22 de Enero de 1.979

20 CARLOS ROEB  
P. P.

Fdo: Francisco del Peze

25

30