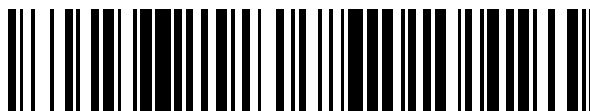


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 119**

51 Int. Cl.:

**C14C 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011** **E 11726797 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2585618**

54 Título: **Eliminación de pelo enzimática de pieles y cueros**

30 Prioridad:

**22.06.2010 EP 10166873**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.07.2014**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)  
Krogshøjvej 36  
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**SOERENSEN, NIELS HENRIK;  
HOFF, TINE;  
OESTERGAARD, PETER RAHBEK y  
CASSLAND, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 474 119 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Eliminación de pelo enzimática de pieles y cueros

**5 REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS**

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma informáticamente legible.

**10 CAMPO DE LA INVENCION**

[0002] La presente invención se refiere a un método para debilitar el pelo en pieles que utilizan una glutamil endopeptidasa. Además, se refiere a un proceso de ribera (beamhouse) más rápido y más respetuoso con el medio ambiente.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] Los procesos de ribera tradicionales o el proceso húmedo limpian las pieles y los cueros y los preparan para otro tratamiento como recurtido, engrasado, tinte y acabado. El proceso de ribera incluye los pasos de remojo (eliminación de suciedad y rehidratación), eliminación de pelo (eliminación de pelo, generalmente parte del proceso de enalado), enalado (eliminación de pelo y liberación de grasas y proteínas al igual que inflamación de la estructura de colágeno), descarnado (eliminación de tejido adiposo), división (corte horizontal en la división del grano y división de carne), desenalado (liberación de cal y reducción de pH), rendido (eliminación de proteínas, eliminación de rabito y apertura de fibra), y piquelado (reducción del valor de pH alrededor de 3) y curtido (estabilización de la piel o matriz de cuero). El producto de este proceso es generalmente conocido como wet blue.

[0004] Las enzimas se han usado en la industria del cuero desde hace 100 años aproximadamente (Uhlig, capítulo 5.9 en Industrial Enzymes and their application 1998 por John Wiley & Sons). Actualmente, las enzimas se usan con éxito relativo en el remojo, la eliminación de pelo, el baño y el desengrasado (Thanikaivelan et al, 2004, Trend in Biotechnology 22,181-187).

[0005] La eliminación apropiada del pelo de la superficie externa y de los folículos pilosos es muy importante para asegurar la superficie lisa y blanda del grano y para asegurar la uniformidad en el color del cuero. El método de eliminación de pelo de cueros y pieles practicado más frecuentemente es el procedimiento químico que usa cal y sulfuro de sodio. Se estima que menos del 2 % de los procesos de ribera usa enzimas para la eliminación de pelo. El sulfuro principalmente actúa cortando los enlaces de disulfuro de las moléculas de queratina. Esta acción se ayuda del hidróxido cálcico (cal), que suelta la estructura de colágeno a través de inflamación y libera proteínas no colagenosas interfibrilares. Este proceso es el sistema convencional de quema de pelo o de reducción de pulpa.

[0006] Los métodos de eliminación de pelo enzimática son conocidos como una alternativa al procedimiento químico convencional respetuosa con el medio ambiente. Los ejemplos de eliminación de pelo enzimática están descritos en US 3,840,433, US 4,636,222, WO 1994/06942, US 5,834,299 y WO 2008/093353. La enzima digiere las células basales del bulbo capilar y las células de la capa de Malpighi (los dos estratos más internos de la epidermis). Esto es seguido por la debilitación del pelo con un ataque en la capa más exterior y descomposición posterior de la capa de la raíz interna y partes del pelo que no están queratinizadas completamente. Las enzimas usadas en la eliminación de pelo son generalmente proteolíticas lo cual cataliza la descomposición de proteínas. Ejemplos de proteasas que han sido usadas son los extractos de proteasa más o menos crudos de origen fúngico o bacteriano que contienen actividades de peptidasa diferentes, al igual que proteasas más puras tales como elastasa, subtilisinas, tripsinas, quimiotripsina, proteasas aspárticas, proteasa de cisteína y metaloproteasas. No obstante, debido a que las pieles y cueros principalmente están formados por colágenos que son susceptibles a la degradación por proteasa, hay un riesgo de daño del grano a la piel o cuero cuando se usan proteasas. Además, las proteasas pueden no ser capaces de eliminar el pelo completamente, dejando un resto no deseado y, potencialmente, un color desigual en las pieles o cueros.

[0007] Se necesitan esfuerzos continuos para diseñar una enzima ideal para la eliminación de pelo, que proporcione suficiente eliminación del pelo y daño mínimo al cuero. Además, también se desea la generación de un proceso de ribera más respetuoso con el medio ambiente.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

[0008] Un aspecto de la presente invención es el uso de una glutamil endopeptidasa para pelos débiles en pieles y/o cueros, que produce la eliminación mejorada de pelo, raíces capilares y papilas capilares en el cuero.

[0009] Otro aspecto de la presente invención es un proceso de ribera modificado, que incluye un paso de eliminación de pelo de glutamil endopeptidasa. El proceso modificado reduce el tiempo de procesamiento y también permite la reducción o invalidación de productos químicos contaminantes tales como sulfuro y cal.

## Definiciones

[0010] El término " glutamil endopeptidasa " se refiere a una peptidasa, preferiblemente una serina endopeptidasa que corta en el lado carboxi terminal de un residuo de ácido glutámico y hasta cierto punto de un residuo de ácido aspártico dependiendo del tampón. Las peptidasas clasificadas como enzimas EC 3.4.21.19 o como enzimas EC 3.4.21.82 son glutamil endopeptidasas. Las enzimas clasificadas fuera de estas clases EC pueden ser también, no obstante, glutamil endopeptidasas. Se puede evaluar si una peptidasa es una glutamil endopeptidasa probando su preferencia para quebrantar Glu-|-Xaa en comparación con Non-Glu-|-Xaa. Una prueba de cribado para identificar si una serina endopeptidasa es una glutamil endopeptidasa adecuada para esta invención se describe en el método del Ejemplo 1. Este ensayo es también adecuado para identificar actividad de glutamil endopeptidasa.

[0011] El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido que es purificado por la mano humana con respecto al polipéptido encontrado en la naturaleza. En un aspecto, el polipéptido es al menos un 1 % puro, por ejemplo al menos un 5 % puro, al menos un 10 % puro, al menos un 20 % puro, al menos un 40 % puro, al menos un 60 % puro, al menos un 80 % puro, y al menos un 90 % puro, como se determina por SDS-PAGE. Preferiblemente, el polipéptido aislado de la presente invención es una peptidasa aislada.

[0012] El término "LVU" o "unidad Löhlein-Volhard" es una medición para la actividad de proteasa. Una LVU es la cantidad de enzima, que degrada 1,725 mg de caseína bajo las condiciones establecidas aquí (50 mg/ml de caseína disuelta en agua, pH ajustado con NaOH a 8,2, temperatura 37 °C, pH 8,2 y tiempo de reacción 60 minutos). La reacción se detiene añadiendo HCl y la caseína no degradada se precipita con sulfato de sodio. El consumo de álcali (NaOH) en la retitulación de un filtrado de muestra menos el consumo de álcali (NaOH) en la retitulación de un filtrado vacío es una medida directa de la actividad de proteasa. Cuanto más caseína se degrada y por lo tanto no precipitable, más NaOH se necesita en la retitulación. (A. Kuntzel: Gerbereichemisches Taschenbuch, 6ª edición, pág. 85, Dresde y Leipzig, Alemania, 1955).

[0013] El término "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final después de la traducción y de cualquier modificación post-traduccional, tal como el procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. El polipéptido maduro puede variar dependiendo del huésped en el que está expresado. En un aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos de 95 a 316 de SEC ID nº: 1 o aminoácidos de 89 a 303 de SEC ID nº: 2 o aminoácidos de 94 a 313 de SEC ID nº: 3 o aminoácidos de 93 a 314 de SEC ID nº: 4 o aminoácidos de 69 a 288 de SEC ID nº: 5 o aminoácidos de 69 a 336 de SEC ID nº: 5, aminoácidos de 121 a 342 de SEC ID nº: 6, ácidos de 97 a 318 de SEC ID nº: 7 o aminoácidos de 169 a 355 de SEC ID NO:8.

[0014] El término "identidad de secuencias" como se utiliza en este caso describe la relación entre dos secuencias de aminoácidos. Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementó en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización abierta de gap de 10, penalización de extensión de gap de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle calificada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculada de la siguiente manera:

$$\text{(Residuos Idénticos x 100)} / \text{(Longitud de la Alineación – Número Total de Espacios en la Alineación)}$$

[0015] El término "polipéptido substancialmente puro" se refiere a una preparación que contiene como mucho un 10 %, como mucho un 8 %, como mucho un 6 %, como mucho un 5 %, como mucho un 4 %, como mucho un 3 %, como mucho un 2 %, como mucho un 1 %, y como mucho un 0,5 % en peso de otro material de polipéptido con el cual es asociado originalmente o recombinantemente. Preferiblemente, el polipéptido es al menos un 92 % puro, por ejemplo al menos un 94 % puro, al menos un 95 % puro, al menos un 96 % puro, al menos un 97 % puro, al menos un 98 % puro, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % puro, y un 100 % puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto puede ser realizado, por ejemplo, preparando el polipéptido a través de métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

## 55 Glutamil endopeptidasa

[0016] La presente invención proporciona un método enzimático para la debilidad capilar en pieles o cueros que comprende un tratamiento de las pieles o cueros con una glutamil endopeptidasa en una solución acuosa.

60 [0017] Esta actividad específica hacia el ácido glutámico ha probado ser una ventaja en la eliminación de pelo. El tratamiento con glutamil endopeptidasa resultó eficaz en la eliminación del pelo incluso en los folículos donde el pelo es generalmente difícil de eliminar con tratamiento enzimático. Debido a que los residuos de ácido glutámico también están presentes en el colágeno, fue sorprendente, considerando esta eliminación del pelo eficaz, observar

un grado muy bajo de daño del grano en pieles y cueros tratados con glutamil endopeptidasa.

[0018] La debilitación del pelo es parte del proceso de eliminación de pelo. Una vez que la estructura de queratina de la capa de raíz interna y externa del pelo es debilitada, se volverá débil y será más susceptible a la acción mecánica al igual que a otra acción química o enzimática. Si un pelo ha sido debilitado se puede evaluar raspando manualmente a través de la piel o cuero, por ejemplo con un clavo u otro material duro: si el capilar sale se puede considerar como debilitado. Esto también puede ser evaluado a través de microscopía electrónica si la capa muestra señales de descomponerse cuando se compara con las capas de una piel o cuero no tratado.

[0019] En el método de la presente invención la glutamil endopeptidasa se usa en una cantidad eficaz. Ésta es una cantidad que consigue un efecto de pelo débil en comparación con una piel o cuero sometido al mismo tratamiento sin glutamil endopeptidasa. El experto en la materia entenderá que la cantidad de glutamil endopeptidasa necesitada para proporcionar un efecto de pelo débil puede depender de la actividad específica de la glutamil endopeptidasa usada al igual que las condiciones de tratamiento. Sugerencias para condiciones adecuadas, incluyendo el margen de pH, la composición de baño, el volumen de baño, las actividades enzimáticas adicionales y el período de incubación, se discuten en la siguiente sección "eliminación de pelo". Estas condiciones se pueden aplicar igualmente al método para debilitar el pelo. La identificación de la cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa está sujeta a optimización bajo estas condiciones variables, que es considerado trabajo de rutina para el experto en la materia. En una forma de realización preferida de la presente invención la cantidad de glutamil endopeptidasa está en la gama de 5 a 1000 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, más preferiblemente en la gama de 10 a 900 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, más preferiblemente en la gama de 15 a 800 mg de proteína de enzima pura/ kg de cuero o piel más preferiblemente en la gama de 20 a 700 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, más preferiblemente en la gama de 25 a 600 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, más preferiblemente en la gama de 30 a 500 mg proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, más preferiblemente en la gama de 35 a 400 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, incluso más preferiblemente en la gama de 40 a 300 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, incluso más preferiblemente en la gama de 50 a 200 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero, incluso más preferiblemente en la gama de 60 a 100 mg de proteína de enzima pura/ kg de cuero o piel y más preferiblemente en la gama de 40 a 80 mg de proteína de enzima pura/ kg de piel o cuero.

[0020] Un polipéptido con actividad de glutamil endopeptidasa se puede aislar u obtener por microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada significa que el polipéptido codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una tensión donde el polinucleótido de la fuente ha sido insertado. En un aspecto, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretado extracelularmente. En una forma de realización preferida, la glutamil endopeptidasa es un polipéptido sustancialmente puro.

[0021] La glutamil endopeptidasa puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, la glutamil endopeptidasa puede ser un polipéptido derivado de bacterias gram-positivas tales como un polipéptido *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces* con actividad de glutamil endopeptidasa, o un polipéptido derivado de bacterias gram-negativas tales como un polipéptido *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Mesorhizobium*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhodopirellula*, *Salmonella*, *Sorangium* o *Ureaplasma* con actividad de glutamil endopeptidasa.

[0022] En un aspecto, la glutamil endopeptidasa es derivada del género de *Bacillus*, más preferiblemente de unas especies seleccionadas del grupo consistiendo en el *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus halmपालus*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*. Alternativamente, la glutamil endopeptidasa se puede derivar de unas especies seleccionadas del grupo consistiendo en *Clostridium tetani*, *Mesorhizobium lotii*, *Sorangium cellulosum*, *Rhodopirellula baltica*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equi<sub>zoo</sub> epidemicus*, *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0023] Las glutamil endopeptidasas adecuadas para usar en la presente invención se pueden identificar según el método del Ejemplo 1. En una forma de realización preferida de la presente invención la glutamil endopeptidasa tiene una proporción de glutamil endopeptidasa de al menos 10.

[0024] En una forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Bacillus licheniformis* indicada en SEC ID n°: 1, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID n°: 1, más preferiblemente los aminoácidos de 95 a 316 de SEC ID n°: 1. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto al polipéptido maduro de SEC ID n°: 1 preferiblemente con respecto a aminoácidos del 95 al 316 de SEC ID n°: 1, donde el polipéptido tiene actividad de

glutamil endopeptidasa. La clonación del ADN que codifica la SEC ID nº: 1 al igual que la expresión SEC ID nº: 1 está descrita en EP 482879. La glutamil endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* está también descrita en US 4,266,031 y WO 1991/13554.

5 [0025] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Bacillus pumilus* Ja96 indicada en SEC ID nº: 2, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID nº: 2, más preferiblemente los aminoácidos del 89 al 303 de SEC ID nº: 2. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 preferiblemente respecto a los aminoácidos del 89 al 303 de SEC ID nº: 2, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La clonación del ADN que codifica la SEC ID nº: 2 al igual que la expresión de SEC ID nº: 2 está descrita en WO 01/16285 donde SEC ID nº: 12 corresponde a SEC ID nº: 2 de la presente aplicación. La SEC ID nº: 2 está también disponible como número de acceso de UNIPROT Q2HXL7. Miyaji et al, 2006 J. Jpn. Ass. Food Preserv. Sci. 32:5-11 también describe la purificación y caracterización de esta glutamil endopeptidasa.

20 [0026] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Bacillus subtilis* indicada en SEC ID nº: 3, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID nº: 3, o más preferiblemente aminoácidos del 94 al 313 de SEC ID nº: 3. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de SEC ID nº: 3 preferiblemente respecto a los aminoácidos del 89 al 303 de SEC ID nº: 3, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La Figura 14 de US 5,589,383 divulga el ADN y la secuencia de proteína que corresponde con SEC ID nº: 3 y caracteriza al polipéptido. La clonación y expresión están además descritas en WO 2001/16285 donde SEC ID nº: 14 corresponde a SEC ID nº: 3 de la presente invención.

30 [0027] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Bacillus licheniformis* indicada en SEC ID nº: 4, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID nº: 4, o más preferiblemente aminoácidos del 93 al 314 de SEC ID nº: 4. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de SEC ID nº: 4 preferiblemente respecto a los aminoácidos del 93 al 314 de SEC ID nº: 4, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La clonación del ADN de codificación de la SEC ID nº: 4 al igual que la expresión de SEC ID nº: 4 está descrita en WO01/16285 donde SEC ID nº: 6 corresponde a SEC ID nº: 4 de la presente aplicación.

40 [0028] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Staphylococcus aureus* indicada en SEC ID nº: 5, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID nº: 5, o más preferiblemente aminoácidos del 69 al 288 de SEC ID nº: 5 o aminoácidos del 69 al 336 de SEC ID nº: 5. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de la identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de SEC ID nº: 5 preferiblemente respecto a aminoácidos del 69 al 288 de SEC ID nº: 5 o aminoácidos del 69 al 336 de SEC ID nº: 5, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La glutamil endopeptidasa de SEC ID nº: 5 está disponible bajo el número de accesión de UNIPROT POC1U8 y su clonación y expresión están descritas en JP4211370 y en Carmona and gray, 1987, Nucl Acid Res.15: 6757.

50 [0029] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Bacillus horikoshii* indicada en SEC ID nº: 6, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID nº: 6, más preferiblemente los aminoácidos del 121 al 342 de SEC ID nº: 6. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de SEC ID nº: 6 preferiblemente respecto a los aminoácidos del 121 al 342 de SEC ID nº: 6, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La clonación del ADN de codificación de la SEC ID nº: 6 al igual que la expresión de SEC ID nº: 6 es descrita en WO01/16285 donde SEC ID nº: 4 corresponde a SEC ID nº: 6 de la presente solicitud.

60 [0030] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Bacillus licheniformis* indicada en SEC ID nº: 7, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID nº: 7, más preferiblemente o aminoácidos del 97 al 318 de SEC ID nº: 7. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de SEC ID nº: 7 preferiblemente respecto a los aminoácidos del 97 al 318 de SEC ID nº: 7, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La clonación del ADN de codificación de la SEC ID nº: 7 al igual que la expresión de la SEC

ID n°: 7 está descrita en WO 2001/16285 donde SEC ID n°: 10 corresponde a SEC ID n°: 7 de la presente solicitud.

[0031] En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es la proteasa específica de glu de *Streptomyces griseus* indicada en SEC ID n°: 8, preferiblemente la glutamil endopeptidasa madura de SEC ID n°: 8, o más preferiblemente los aminoácidos del 169 al 355 de SEC ID n°: 8. En otra forma de realización la glutamil endopeptidasa es un polipéptido con al menos 60 %, por ejemplo al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90%, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n°: 8 preferiblemente a los aminoácidos 169 a 355 de SEC ID n°: 8, donde el polipéptido tiene actividad de glutamil endopeptidasa. La clonación y caracterización del gen que codifica la secuencia de proteínas que corresponde a la SEC ID n°: 8 se describe en: Sidhu S. S., Kalmar, G.B, Borgford T.J.: Characterization of the gene encoding the glutamic-acid-specific protease of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Cell. Biol.* 71:454-461 (1993).

[0032] Las identidades de secuencias de las glutamil endopeptidasas de la SEC ID n°: 1 a 8 se indicna a continuación:

	ID1	ID2	ID3	ID4	ID5	ID6	ID7	ID8
ID1	100,00	35,15	47,62	80,19	30,04	37,28	83,12	33,33
ID2	35,15	100,00	35,48	38,73	29,23	39,72	40,21	31,18
ID3	47,62	35,48	100,00	46,60	31,15	34,06	46,98	29,54
ID4	80,19	38,73	46,60	100,00	32,30	36,93	85,94	30,94
ID5	30,04	29,23	31,15	32,30	100,00	30,26	28,84	28,40
ID6	37,28	39,72	34,06	36,93	30,26	100,00	39,86	25,11
ID7	83,12	40,21	46,98	85,94	28,84	39,86	100,00	31,10
ID8	33,33	31,18	29,54	30,94	28,40	25,11	31,10	100,00

[0033] En una forma de realización preferida la glutamil endopeptidasa usada en la presente invención es sustancialmente pura.

[0034] Una glutamil endopeptidasa, o una o varias glutamil endopeptidasas, se pueden adicionar a un proceso de ribera convencional tal como el descrito en el Ejemplo 2 o variaciones del mismo. La glutamil endopeptidasa puede por ejemplo ser adicionada en el remojo convencional, preferiblemente las últimas 1 a 4 horas del remojo. Alternativamente, se puede adicionar como un paso separado antes o después del paso de encalado convencional.

[0035] En una forma de realización preferida de la presente invención una glutamil endopeptidasa o una o varias glutamil endopeptidasas, por ejemplo una o varias seleccionadas del grupo que consiste en la glutamil endopeptidasa o glutamil endopeptidasa madura de SEC ID n°: 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 y 8, se aplica en un proceso de ribera modificado como se describe en la sección "proceso de ribera" a continuación.

### Proceso de ribera

[0036] El proceso de la presente invención se puede aplicar a cualquier piel o cuero usados de forma convencionalmente para la fabricación de cuero. En particular, el proceso de la invención se puede aplicar a pieles ovinas, pieles porcinas, pieles bovinas, o pieles caprinas.

[0037] En los pasos de los procesos descritos después de los porcentajes son el peso del cuero, de la piel o de la piel de animal a menos que se indique lo contrario.

### Remojo

[0038] Cuando las pieles saladas se introducen en el proceso de ribera, se someten a un remojo de eliminación de suciedad para eliminar sal y suciedad. La duración se puede adaptar al proceso de ribera y puede variar de 1 hora a 12 horas, preferiblemente entre 1 y 2 horas. El remojo de eliminación de suciedad convencional es realizado sin enzimas. En una forma de realización preferida de la presente invención el remojo de eliminación de suciedad es realizado sin adición de enzimas. En una forma de realización alternativa una enzima preferiblemente una serina proteasa, más preferiblemente una subtilisina, una tripsina, proteasa tipo tripsina o quimiotripsina, la proteasa se puede aplicar en una cantidad de 6000 LVU/ kg de cuero a 130000 LVU/kg de cuero, preferiblemente de 12000 LVU/kg de cuero a 75000 LVU/ kg de cuero, más preferiblemente de 24000 LVU/ kg de cuero a 48000 LVU/ kg de cuero. Las proteasas adecuadas son descritas en la sección "Enzimas de procesamiento de cuero". En general, el baño del remojo se descarta al final del remojo.

[0039] El remojo de eliminación de suciedad es normalmente seguido de un remojo más largo que de forma convencional es de entre 8 y 72 horas. Este remojo sirve para rehidratar las pieles o cueros y comienza la abertura de la estructura fibrosa. En una forma de realización preferida de la presente invención el tiempo de remojo se reduce de 1 a 6 horas, preferiblemente entre 1,5 y 5 horas, incluso más preferiblemente entre 2 y 4 horas, y de la forma más preferible entre 2 y 3 horas. El paso del remojo puede comprender una cantidad eficaz de alfa-amilasa

que se añade al paso de remojo. Las alfa-amilasas adecuadas están descritas en la sección "Enzimas de procesamiento de cuero". La cantidad eficaz se puede evaluar por el experto en la materia, preferiblemente es entre 1 mg y 1000 mg de proteína enzimática /kg de piel o cuero, preferiblemente de 5 mg y 500 mg de proteína enzimática /kg de piel o cuero, más preferiblemente de 7 mg y 250 mg de proteína enzimática /kg de piel o cuero, más preferiblemente de 10 mg y 150 mg de proteína enzimática /kg de piel o cuero, de la forma más preferible de entre 12 mg y 75 mg de proteína enzimática /kg de piel o cuero. Además de la amilasa una proteasa se puede adicionar al paso de remojo, preferiblemente una serina proteasa, más preferiblemente una subtilisina o una tripsina o proteasa tipo tripsina o una quimiotripsina. La proteasa se puede aplicar en una cantidad de entre 6000 LVU / kg de cuero a 130000 LVU/kg de cuero, preferiblemente de 12000 LVU/kg de cuero a 75000 LVU / kg de cuero, más preferiblemente de 24000 LVU / kg de cuero a 48000 LVU / kg de cuero en peso de piel o cuero. Las proteasas adecuadas están descritas en la sección "Enzimas de procesamiento de cuero".

[0040] Los pasos de remojo anteriores son generalmente realizados en pala, tambor o mezclador porque la agitación mecánica acelera el proceso de remojo. Como una directiva, las pieles se mojan en el tambor con un baño del 100 % al 400 %, preferiblemente del 200% y las pieles de oveja especialmente para lana se mojan en la pala con un baño de hasta 2000 %. En general, el baño del remojo se descarta al final del remojo.

[0041] Un proceso de remojo de la presente invención se puede realizar en condiciones de remojo convencionales, es decir el pH del baño del remojo en la gama de pH de 4 a 12, preferiblemente la gama de pH de 6 a 10, de la forma más preferible la gama de pH de 7 a 9; una temperatura en la gama de 5 °C a 32 °C, preferiblemente en la gama de 15 °C a 30 °C, más preferiblemente en la gama de 20 °C a 30 °C, y potencialmente junto con conservantes y tensoactivos conocidos tales como biocidas, si es necesario.

#### Eliminación de pelo

[0042] Como se describe en la sección anterior, la eliminación de pelo se realiza convencionalmente con sulfuro y cal, o alternativamente usando proteasas tales como tripsina, quimiotripsina y subtilisinas.

[0043] La presente invención proporciona un proceso de eliminación de pelo eficaz y más respetuoso con el medio ambiente. En el proceso de eliminación de pelo de la presente invención una glutamil endopeptidasa se utiliza para tratar las pieles mojadas. Las glutamil endopeptidasas están descritas en la sección "Glutamil endopeptidasa" pues son las cantidades eficaces y cantidades preferidas de la enzima.

[0044] Las condiciones bajo las cuales el tratamiento con glutamil endopeptidasa es realizado pueden variar según la enzima específica o una combinación de enzimas elegidas. Alguno de los parámetros que pueden variar son descritos abajo. Los parámetros pueden variar solos o cualquier combinación de los parámetros pueden variar al mismo tiempo.

[0045] En un aspecto de la invención el tratamiento con glutamil endopeptidasa de las pieles mojadas va precedido por un tratamiento con una alfa-amilasa. Preferiblemente, el tratamiento de alfa-amilasa es realizado entre 1 y 6 horas, preferiblemente entre 1 a 5 horas, más preferiblemente entre 1,5 y 5 horas, incluso más preferiblemente entre 2 y 4 horas, y de la forma más preferible entre 2-3 horas. El pretratamiento de alfa-amilasa puede ser incorporado en el paso de remojo como se ha descrito anteriormente, este puede ser un tratamiento combinado con el siguiente paso de eliminación de pelo o puede ser un tratamiento separado. La cantidad de alfa-amilasa es como se describe en la sección anterior "remojo". Además, el tratamiento de alfa-amilasa se puede realizar en presencia de una proteasa preferiblemente una serina proteasa (EC 3.4.21), más preferiblemente una subtilisina, también como se describe en la sección anterior "remojo".

[0046] El tiempo de tratamiento de glutamil endopeptidasa se puede ajustar según la actividad de la enzima, preferiblemente el tiempo de tratamiento es de tal manera que hay una eliminación de pelo suficiente y muy limitada a que no haya ningún daño del grano que se pueda evaluar según los principios del Ejemplo 3 y 4. En una forma de realización de la presente invención el tiempo de tratamiento es entre 1 y 5 horas, preferiblemente entre 1,5 y 4 horas, más preferiblemente entre 2 y 3 horas y de la forma más preferible entre 1,5 y 2,5 horas.

[0047] El pH óptimo de la glutamil endopeptidasa debería ser considerado cuando se elige el margen del pH donde la eliminación de pelo es realizada. La actividad de la enzima puede hasta cierto punto ser controlada por cambios en el pH, así si se desea la actividad óptima el pH debería ser elegida en una gama de +/- 1 unidad pH del óptimo pH de la enzima (medido a la temperatura de tratamiento). En una forma de realización de la invención el pH está en la gama de 5,5 a 12,5, preferiblemente en la gama de 6 a 12, más preferiblemente en la gama de 6,5 a 11, más preferiblemente en la gama de 7 a 10, más preferiblemente en la gama de 7,5 a 9,5, de la forma más preferible en la gama de 8 a 9. Si se desea reducir la actividad, por ejemplo para controlar daño del grano, el pH se puede elegir de manera que esté fuera del margen de pH óptimo de la enzima (ver por ejemplo US 4,636,222). Alternativamente, el pH se puede cambiar durante el tratamiento de glutamil endopeptidasa, por ejemplo del pH óptimo a un pH que está fuera del margen del pH óptimo de la enzima durante el proceso de eliminación de pelo. En una forma de realización el cambio del pH es a un pH donde la enzima pierde su actividad. En otra forma de realización el tratamiento se realiza en la gama de 6,5 a 9,5, más preferiblemente en la gama de 7 a 9 para un periodo de 1 a 4 horas,

preferiblemente 1 a 3 horas, más preferiblemente de 1 a 2 horas seguido de un aumento en pH por encima de 11, más preferiblemente por encima de 12. En una forma de realización preferida el tratamiento de glutamil endopeptidasa se realiza en el margen de pH de 5,5 a 10, seguido de un aumento gradual en pH a por encima de 11. El aumento de pH es hecho gradualmente a lo largo de 1 a 4 horas, más preferiblemente de 2 a 3,5 horas, de la forma más preferible 2,5 a 3,5 horas. Este aumento en pH además sirve para hinchar la piel o cuero a un tamaño que hace más fácil ejecutar el descarnado y la división.

[0048] En un aspecto de la invención el tratamiento de eliminación de pelo se puede realizar con glutamil endopeptidasa como la única fuente de actividad enzimática o preferiblemente como la única fuente de actividad proteolítica. Alternativamente, otras actividades enzimáticas se pueden adicionar a la glutamil endopeptidasa incluyendo alfa-amilasa y/o proteasa. En una forma de realización preferida la eliminación de pelo se realiza en presencia de una proteasa, preferiblemente una serina proteasa (EC 3.4.21), más preferiblemente una tripsina o una proteasa de tipo tripsina, quimiotripsina o una subtilisina. La proteasa se puede aplicar en una cantidad de 700 - 3.500.000 LVU/kg de piel o cuero, preferiblemente de 3500 - 2.100.000 LVU/kg de cuero, más preferiblemente de 7000 - 1.400.000 LVU/kg de cuero, incluso más preferiblemente de 35000 - 1.000.000 LVU/kg de cuero o piel. Las proteasas adecuadas están descritas en la sección "Enzimas de procesamiento de cuero". En una forma de realización preferida se usa NovoBate<sup>®</sup> 115.

[0049] La composición del baño se puede optimizar y variar como sea adecuado. El experto en la materia sabrá hacer tales variaciones. Generalmente, la composición del baño se basa en agua; el pH de la composición se puede ajustar añadiendo un compuesto alcalino o ácido. Para el pH alcalino (por encima de pH 7), la ceniza de soda o las sales de hidróxido, por ejemplo NaOH, o Ca(OH)<sub>2</sub>, se usan generalmente para ajustar el pH, el experto en la materia puede no obstante fácilmente sustituir estos con otras sustancias alcalinas. Para el pH ácido (por debajo de 7), se usan generalmente el ácido sulfúrico o el ácido fórmico, el experto en la materia puede no obstante fácilmente sustituir estos con otras sustancias ácidas. El baño también puede contener un conservante como un biocida para prevenir la contaminación de las pieles o cueros durante el tratamiento.

[0050] El tratamiento de eliminación de pelo es generalmente realizado en relación con acción mecánica, p. ej. utilizando una pala, un tambor o un mezclador como agitación mecánica aceleran proceso. Como una directiva, las pieles se tratan en un tambor con un baño del 50 % al 400 %, preferiblemente del 100 % al 200 % y pieles de oveja especialmente para lana se tratan en la pala con un baño de hasta el 2000 %. En la conclusión del tratamiento de eliminación de pelo el baño es generalmente descartado y el pelo se quita del sistema.

[0051] El tratamiento se puede realizar en la gama de temperatura de 5 °C a 32 °C, preferiblemente en la gama de 15 °C a 30 °C, más preferiblemente en la gama de 20 °C a 30 °C.

[0052] Una forma de realización de la presente invención es un proceso para eliminar el pelo de pieles que incluye las etapas a) tratamiento de pieles con una cantidad eficaz de alfa-amilasa en una solución acuosa; y b) debilitación del pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa. Donde el paso a) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo" o "remojo" y el paso b) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo". Opcionalmente, si el pH del tratamiento de glutamil endopeptidasa es inferior a 10, un paso de pH en aumento se añade después del paso b). Este paso gradualmente aumenta el pH a por encima de 11 en un periodo de 1 a 4 horas.

#### 45 Encalado

[0053] El paso de encalado es el paso de eliminación de pelo convencional en el proceso de ribera que aplica sulfuro para reducir los puentes de disulfuro en las moléculas de queratina, y cal para soltar la estructura de colágeno y liberar proteínas no colagenosas interfibrilares.

[0054] En un aspecto de la presente invención el tratamiento con sulfuro y cal o las alternativas a estos productos químicos se pueden omitir debido a que la eliminación de pelo obtenida por el tratamiento con glutamil endopeptidasa como se ha descrito anteriormente es suficientemente eficaz por sí sola. En una forma de realización de la presente invención del pelo es debilitado o eliminado, por ejemplo el proceso de eliminación de pelo o todo proceso de ribera es realizado sin la adición de sulfuro (o de una sustancia química alternativa de reducción de disulfuro, sin incluir enzimas que reducen enlaces de disulfuro), preferiblemente todo proceso de ribera es realizado sin adición de sulfuro (o de una sustancia química alternativa de reducción de disulfuro, sin incluir enzimas que reducen enlaces de disulfuro). En otra forma de realización el pelo es debilitado o eliminado, por ejemplo el proceso de eliminación de pelo es realizado, sin la adición de un agente de encalado. En otra forma de realización de la presente invención el pelo es debilitado o eliminado, por ejemplo el proceso de eliminación de pelo o todo el proceso de ribera es realizado sin adición de un agente de encalado y sin la adición de sulfuro (o de una sustancia química alternativa de reducción de disulfuro, sin incluir enzimas que reducen los enlaces de disulfuro). Una de las ventajas de no utilizar sulfuro es que el pelo permanece intacto (un proceso de ahorro de pelo), que es significativamente mejor para el medio ambiente que el pelo disuelto por sulfuro.

[0055] En otro aspecto de la presente invención la eliminación de pelo es incluso más eficaz mediante la realización



de un tratamiento con un sulfuro y/o un agente de encalado. En una forma de realización preferida de la presente invención la piel es obtenida después del paso b) en el proceso de eliminación de pelo anteriormente descrito sujeto a un tratamiento sulfúrico o a un tratamiento con un compuesto de reducción de disulfuro de proteína alternativo. Consecuentemente, el tratamiento de glutamil endopeptidasa va seguido de un tratamiento sulfúrico o de un tratamiento con un compuesto de reducción de disulfuro de proteína alternativo para liberar el pelo incluso más eficazmente. A continuación se debe entender que cuando se usa el término sulfuro, éste incluye el compuesto alternativo de reducción de disulfuro de proteína a menos que se declare lo contrario. El experto en la materia conocerá qué sulfuros son adecuados en el proceso de ribera, algunos ejemplos son  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{CaS}$  y  $\text{As}_2\text{S}_3$  y  $\text{NaHS}$  y otras sales del mismo. El compuesto de proteína alternativo reductor de disulfuro podría ser sales de ácido tioglicólico al igual que otros tioles (Mercaptanos) R-S-H, enzimas capaces de catalizar el reordenamiento de los enlaces --S--S-- en proteínas por ejemplo proteína disulfuro reductasas, proteína disulfuro isomerasas, proteína disulfuro oxidasas, proteína disulfuro oxidorreductasa, proteína disulfuro transhidrogenasas, sulfhidrilo oxidasa, y tiorreductinas. El uso de estas enzimas en la eliminación de pelo está descrito en US 5,834,299, en la presente incorporada por referencia. El experto en la materia sabrá optimizar la cantidad de sulfuro. En una forma de realización preferida la cantidad de sulfuro es la gama de 0,01 % a 3 %, preferiblemente de 0,05 % a 2 %, más preferiblemente de 0,1 % a 1,5 %, incluso más preferiblemente de 0,15 % a 1 %, de la forma más preferible de 0,2 % a 0,5 % por kg de cuero, piel o piel animal. En una forma de realización preferida el tratamiento sulfúrico es realizado sin la adición de un agente de encalado.

[0056] En una forma de realización de la invención el tratamiento sulfúrico se realiza en combinación con un agente de encalado. El tratamiento sulfúrico es realizado después del tratamiento con glutamil endopeptidasa, preferiblemente después de la división de la piel. El experto en la materia conocerá qué agentes de encalado son adecuados en el proceso de ribera, algunos ejemplos son la cal convencional (hidróxido cálcico), el hidróxido sódico o las sales de hidróxido alternativas. En una forma de realización de la invención el agente de encalado es hidróxido sódico, que es algo más respetuoso con el medio ambiente que la cal porque no produce residuos como hace la cal. El experto en la materia sabrá optimizar la cantidad de agente de encalado. En una forma de realización preferida la cantidad de agente de encalado está en la gama de 0,01 % a 5 %, preferiblemente de 0,05 % a 4 %, más preferiblemente de 0,1 % a 2,5 %, incluso más preferiblemente de 0,15 % a 1 %, de la forma más preferible de 0,2 % a 0,5 % por kg de cuero, piel o piel animal.

[0057] Otra forma de realización de la presente invención es un proceso para eliminación de pelo de pieles o cueros que incluye las etapas a) tratamiento de pieles o cueros con una cantidad eficaz de alfa-amilasa en una solución acuosa; b) debilitación del pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa; y c) tratamiento de la piel con un agente de encalado y/o un sulfuro. Donde el paso a) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo" o "remojo", el paso b) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo", y c) se puede realizar como se describe en la sección "encalado".

#### Descarnado y división

[0058] El descarnado retira el tejido muscular y grasa todavía en el lado de carne del cuero. La división es un corte horizontal del cuero depilado (piel animal) en una división del grano y una división de carne. La división del grano se usa para la producción de cueros superiores, mientras que la división de carne se puede usar para dividir cuero o gelatina. El descarnado y la división se realizan como pasos separados durante el proceso de ribera, pero para facilitarlos los describimos juntos. El descarnado y la división se realizan convencionalmente después del encalado. En la presente invención el descarnado y la división pueden hacerse después de la eliminación de pelo con glutamil endopeptidasa y antes del encalado y/o tratamiento sulfúrico. La ventaja de este procedimiento es que el peso de la piel disminuye significativamente antes del encalado. Debido a que la cal y el sulfuro se dosifican por kg de cuero, piel o piel animal, la cantidad de cal y sulfuro, que tiene un impacto medioambiental alto, se puede reducir a la misma extensión como la reducción de peso de la piel, cuero o piel animal. Otra ventaja del descarnado y de la división del cuero antes del tratamiento sulfúrico es que la corriente de desechos (carne, grasa y cuero de división) está libre de sulfuro lo que es una ventaja si se procesa para por ejemplo gelatina. En una forma de realización preferida de la presente invención el cuero, la piel o la piel animal son descarnados y divididos antes del tratamiento con sulfuro y/o agente de encalado.

[0059] Otra forma de realización de la presente invención es un proceso para pieles depiladas que incluye los pasos a) tratamiento de pieles con una cantidad eficaz de alfa-amilasa en una solución acuosa; b) debilitación del pelo en una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa; c) descarnado y división de la piel obtenida en b), y d) tratamiento de la piel con un agente de encalado y/o un sulfuro. Donde el paso a) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo" o "remojo", el paso b) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo", el paso c) se puede realizar como se describe en la sección "descarnado y división", y el paso d) se puede realizar como se describe en la sección "encalado". El paso d) puede alternativamente ser realizado antes del paso c) aunque éste no supusiera una ganancia medioambiental.

#### Desencalado

[0060] En el proceso de ribera convencional el desencalado es realizado después del agente de encalado, para

eliminar el agente de encalado de las pieles y reducir el pH entre 8 y 9. La reducción del pH es importante para preparar la piel para la parte restante del proceso de ribera.

5 [0061] En relación con la presente invención se realiza el desencalado o un paso de reducción del pH si el proceso ha hecho uso de un agente de encalado. En el proceso de la presente invención una reducción de pH también se puede realizar aunque un agente de encalado no haya sido usado, por ejemplo en casos donde el tratamiento de glutamil endopeptidasa haya sido realizado bien en un pH por encima de 9 o donde el pH haya sido elevado durante o después del tratamiento de glutamil endopeptidasa.

10 Piquelado y curtido.

15 [0062] Estos procesos son los pasos restantes en el proceso de ribera y no estará afectado por los procedimientos modificados anteriormente descritos. Algunos procesos de ribera también incluyen un paso de disminución que sirve para eliminar proteínas adicionales, éste es, no obstante, un paso opcional en el proceso de ribera de la presente invención. El experto en la materia sabrá como dirigir estos pasos. Un ejemplo de cómo los pasos pueden ser dirigidos está descrito en el Ejemplo 2.

Procesos de ribera modificados

20 [0063] El proceso de ribera modificado de la presente invención puede tomar formas diferentes. Si es técnicamente realizable en relación al proceso de ribera los pasos pueden ser intercambiados. En una forma de realización preferida de la invención el proceso de ribera es reducido entre 20 y 30 horas, preferiblemente entre 22-28 horas, más preferiblemente entre 24 y 26 horas. A continuación se ilustra algún proceso de ribera modificado conforme a la presente invención (estos ejemplos no son agotadores; alternativas que se pueden construir combinando diferentes características de la descripción anterior son también consideradas una parte de la presente invención).

[0064] Un proceso para preparar un wet blue comprende los pasos siguientes:

- 30 a) un remojo de eliminación de suciedad;  
 b) un remojo que comprende una alfa-amilasa y opcionalmente una proteasa;  
 c) eliminación de pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa;  
 d) descarnado y división de la piel obtenida en c);  
 e) desencalado; y  
 35 e) piquelado y curtido.

[0065] Donde los pasos a) y b) se pueden realizar como se describe en la sección "remojo", el paso c) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo" y d) se puede realizar como se describe en la sección "descarnado y división".

40 [0066] Un proceso para preparar un wet blue comprende los pasos siguientes:

- a) un remojo de eliminación de suciedad;  
 b) un remojo que comprende una alfa-amilasa y opcionalmente una proteasa;  
 45 c) eliminación de pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa;  
 d) descarnado y división de la piel obtenida en c)  
 e) tratamiento con un agente de encalado y/o un sulfuro  
 f) desencalado;  
 g) piquelado y curtido.

50 [0067] Donde los pasos a) y b) se pueden realizar como se describe en la sección "remojo", el paso c) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo", el paso d) se puede realizar como se describe en la sección "descarnado y división", el paso e) se puede realizar como se describe en la sección "encalado".

[0068] Un proceso para preparar un wet blue comprende los pasos siguientes:

- 55 a) un remojo de eliminación de suciedad;  
 b) un remojo que comprende una alfa-amilasa y opcionalmente una proteasa;  
 c) eliminación de pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa;  
 d) tratamiento con un agente de encalado y/o un sulfuro;  
 e) descarnado y división;  
 60 f) desencalado; y  
 g) piquelado y curtido.

65 [0069] Donde los pasos a) y b) se pueden realizar como se describe en la sección "remojo", el paso c) se puede realizar como se describe en la sección "eliminación de pelo", el paso d) se puede realizar como se describe en la sección "encalado", paso e) se puede realizar como se describe en la sección "desencalado", y el paso f) se puede realizar como se describe en la sección "descarnado y división".

**Enzimas de procesamiento de cuero**Proteasas

5 [0070] Además de la glutamil endopeptidasa anteriormente descrita otras proteasas o una enzima proteolítica se pueden añadir a pasos diferentes del proceso de fabricación de cuero, por ejemplo para eliminar proteínas no colagenosas, abertura de la estructura fibrosa de la piel.

10 [0071] Las proteasas adecuadas incluyen aquellas animales, vegetales o de origen microbiano. El origen microbiano es preferido. Se incluyen mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína. La proteasa puede por ejemplo ser una metaloendopeptidasa (EC 3.4.24), una cisteína endopeptidasa (EC 3.4.22), una endopeptidasa aspártica (EC 3.4.23) o una serina endopeptidasa (EC 3.4.21). Ejemplos de serinas proteasas son las tripsinas (EC 3.4.21.4), quimiotripsinas (EC 3.4.21.1 y EC 3.4.21.2) subtilisinas (EC 3.4.21.62). Especialmente subtilisinas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, proteasa Bacillus BP92, subtilisina BPN', subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (p. ej., de origen bovino o porcino) y la proteasa *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583 al igual que la tripsina que actúa como proteasas fúngicas obtenidas de *Aschersonia*, *Beauvaria*, *Metarhizium* y *Verticillium* (EP 335,023).

20 [0072] Los ejemplos de serinas proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, y 274.

25 [0073] Ejemplos de proteasas de cisteína son las papainas.

[0074] Las endopeptidasas aspárticas pueden derivar de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* y *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Productos comerciales con endopeptidasas aspárticas son comercializadas bajo los nombres comerciales de Rennilase®, Fromase®, Novoren®, Marzyme®, Hannilase®, Marzyme® y Suparen®.

30 [0075] Enzimas proteásicas preferidas disponibles comercialmente incluyen Biobate® AC, NUE (Novozymes Unhearing Enzyme), Neutrase®, NovoBate® 100, NovoBate® 115, NovoBate® 1547, Novocor S 2500 C, NovoCor® AB, NovoCor® hacha, NovoCor® B, Alcalase®, Savinase®, Primase®, Duralase®, Esperase®, Everlase®, Liquanase®, Relase®, Polarzyme® y Kannase® (Novozymes A/S), Properase®, Purafect®, OxP® Purafect, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.), Ronozyme® ProAct (DSM).

35 Alfa-amilasa

[0076] La amilasa usada en el proceso de la invención puede ser cualquier alfa-amilasa (EC. 3.2.1.1), que cataliza la hidrólisis de almidón y otros oligo y polisacáridos lineales y ramificados 1,4-glucosídicos. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa es una álcali alfa-amilasa, cuando la condición óptima de pH para la reacción es 7-9. Las alfa-amilasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Los mutantes (variantes) modificados química o genéticamente son incluidos.

40 [0077] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa incluye un módulo de unión de carbohidratos (CBM) tal y como se define en WO 05/003311, preferiblemente una familia 20 CBM tal y como se define en WO 05/003311.

45 [0078] En una forma de realización la alfa-amilasa fúngica es de origen de levadura o de hongo filamentoso. Las amilasas alfa preferidas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenibles de especies de *Aspergillus*, en particular del *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* y *A. kawachii*, como la alfa-amilasa ácida divulgada como SWISSPROT P56271, o descrita con más detalle en WO 89/01969 (Ejemplo 3).

50 [0079] En una forma de realización la alfa-amilasa es de origen bacteriano. La alfa-amilasa bacteriana es preferiblemente derivada de una cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, u otra *Bacillus sp.*, tal como *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512 (WO 95/26397), NCIB 12513 (WO 95/26397), DSM 9375 (WO 95/26397), DSMZ 12648 (WO 00/60060), DSMZ 12649 (WO 00/60060), KSM AP1378 (WO 97/00324), KSM K36 o KSM K38 (EP 1,022,334). Se prefieren las alfa-amilasas de *Bacillus sp.* descritas en WO 95/26397 como SEC ID NOS. 1 y 2, respectivamente, la alfa-amilasa AA560 descrita como SEC ID n°: 2 en WO 00/60060. Preferiblemente, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* es la SEC ID n°: 2 como se describe en WO 96/23874.

60 [0080] En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa bacteriana es la alfa-amilasa SP722 descrita como SEC ID n°: 2 en WO 95/26397 o la alfa-amilasa AA560.

65 [0081] Las alfa-amilasas adecuadas para remojo están descritas en WO 10/043709. Las alfa-amilasas indicadas como SEC ID NO:1 y SEC ID NO:4 en WO 10/043709, y los polipéptidos con al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad, más preferiblemente un 95 % de identidad para estas secuencias son también de interés para el tratamiento de amilasa en la presente invención.

5 [0082] Los productos de alfa-amilasa disponibles comercialmente o los productos que comprenden alfa-amilasas incluyen la venta del producto bajo los siguientes nombres comerciales: amilasas disponibles comercialmente pertinentes incluyen Natalase<sup>®</sup>, Stainzyme<sup>®</sup>, Stainzyme Plus, Duramyl<sup>®</sup>, Termamyl<sup>®</sup>, Termamyl Ultra, Fungamyl<sup>®</sup> y BAN<sup>®</sup> (todos disponibles en Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), Bioamilasa - D(G), BIOAMYLASE™ L (Biocon India Ltd) y Rapidase<sup>®</sup> y Purastar<sup>®</sup> (disponible en DSM, Holanda), Purastar OxAm, RAPIDASE™ TEX y Powerase™ (disponible en Danisco A/S) KAM (KAO, Japón).

### EJEMPLOS

10 [0083] La invención está posteriormente ilustrada con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden de ninguna manera limitar el ámbito de la invención como se reivindica.

#### Ejemplo 1

15 [0084] El presente ejemplo describe un ensayo para evaluar si una preparación enzimática es una glutamil endopeptidasa en el contexto de la presente invención.

20 [0085] Glutamil endopeptidasas son las serina endopeptidasas que se adhieren al lado carboxi terminal de un residuo de ácido glutámico (o un residuo de ácido aspártico en los tampones de fosfato), es decir tienen una preferencia para residuos de aminoácidos cargados negativamente en la posición P1.

[0086] El siguiente ensayo fue usado para probar si una peptidasa era una glutamil endopeptidasa.

#### Materiales:

25 [0087]

#### Sustratos:

Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)  
 Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)  
 Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)  
 Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)  
 Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)  
 Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)  
 Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)  
 Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)  
 Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

Todos disponibles en Bachem AG, Bubendorf, Suiza.

Temperatura:

Temperatura ambiente (25°C)

Tampón de ensayo:

100mM ácido succínico, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 150mM KCl, 0,01 % Tritón X-100, pH 9,0.

Enzimas:

30 [0088]

Enzima	SEC ID nº:	Referencias públicas
Glutamil endopeptidasa de <i>B.licheniformis</i>	1	UniProt P80057; EP482879
Glutamil endopeptidasa de <i>Bacillus pumilus</i> Ja96	2	UniProt Q2HXL7 WO20011628 SEC ID NO:12
Subtilisina de <i>B.licheniformis</i> , Alcalase 2,5 L	Ninguno	Disponible en Novozymes A/S
Quimiotripsina bovina	Ninguno	Sigma C-3142 TLCK tratado
Proteasa de tipo tripsina de <i>Fusarium oxysporum</i>	Ninguno	UniProt P35049 PCT/EP2010/054290 SEC ID nº: 2

[0089] Las enzimas fueron purificadas a través de cromatografía hasta una alta pureza. Solo una banda fue vista por cada peptidasa en geles de SDS-PAGE teñidos con coomassie.

35 Método:

40 [0090] Una dilución de 20 µl de peptidasa (diluida en 0,01 % de Tritón X-100) fue colocada en una placa de microtitulación. El ensayo fue iniciado añadiendo 200 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0ml de DMSO y además diluido 90x con el tampón de ensayo). La placa de microtitulación fue colocada en un lector de microplacas VERSAmox de Dispositivos Moleculares y el aumento inicial en OD405 fue monitorizado como una medida de la actividad de peptidasa. Si no se conseguía un gráfico lineal en 4 minutos de tiempo de medición, la peptidasa seguía siendo diluida y el ensayo era repetido.

Resultados:

- 5 [0091] Los resultados de cinco proteasas evaluadas en el ensayo anterior se indican en la Tabla 1 a continuación. Los datos corresponden a las actividades relativas a cada proteasa en los sustratos diferentes Suc-AAPX-pNA, es decir la actividad del sustrato específico Suc-AAPX-pNA dividido por la actividad del sustrato Suc-AAPX-pNA de los nueve sustratos con la máxima actividad. La dilución de la peptidasa fue contabilizada en el cálculo.

Tabla 1

	<b>Glu-endopep. <i>B.licheniformis</i></b>	<b>Glu-endopep. <i>B. pumilus</i> JA96</b>	<b>Alcalasa</b>	<b>Quimiotripsina</b>	<b>Tripsina</b>
Suc-AAPA-pNA	0,00000	0,00373	0,02381	0,00087	0,00000
Suc-AAPR-pNA	0,00001	0,00184	0,00861	0,00619	1,00000
Suc-AAPI-pNA	0,00000	0,00029	0,00012	0,00072	0,00000
Suc-AAPM-pNA	0,00000	0,03411	0,39459	0,34762	0,00002
Suc-AAPV-pNA	0,00000	0,00110	0,00016	0,00037	0,00000
Suc-AAPL-pNA	0,00000	0,02221	0,81752	0,22435	0,00000
Suc-AAPK-pNA	0,00000	0,00234	0,01389	0,00033	0,53071
Suc-AAPF-pNA	0,00001	0,01321	1,00000	1,00000	0,00003
Suc-AAPE-pNA	1,00000	1,00000	0,00112	0,00025	0,00000
<b>Proporción de glutamil endopeptidasa</b>	<b>103100</b>	<b>29</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

- 10 [0092] De los resultados se puede observar que la glutamil endopeptidasa de *B.licheniformis* y la glutamil endopeptidasa de *Bacillus pumilus* JA96 tienen la máxima actividad de sustrato pNA Suc-AAPE-pNA, mientras que tienen actividad relativamente baja hacia los otros sustratos. Consecuentemente, estas dos proteasas se consideran glutamil endopeptidasas.
- 15 [0093] Para valorar si una peptidasa es una glutamil endopeptidasa hemos definido una proporción de glutamil endopeptidasa (GR) que es calculada de la siguiente manera:

$$\text{GR} = \text{actividad de Suc-AAPE-pNA} / \text{Suc-AAPnon(E)-pNA con la mayor actividad}$$

- 20 [0094] Cuando la proporción de glutamil endopeptidasa es 10 o superior, la actividad en cualquiera de los otros 8 sustratos Suc-AAPnon(E)-pNA es inferior al 10 % de la actividad en el sustrato Suc-AAPE-pNA.

- 25 [0095] Una glutamil endopeptidasa según la presente invención es definida como una peptidasa con un GR por encima de 10.

- [0096] La Alcalasa, quimiotripsina y tripsina, las cuales han sido todas usadas en tratamiento de cuero, no se consideran glutamil endopeptidasas según la presente invención.

**Ejemplo 2**

- 30 [0097] Este ejemplo ilustra un proceso de ribera estándar de remojo para curtido. El proceso puede variar de cutidería a curtidería, y es por lo tanto solo un ejemplo, no una receta universal.

- 35 [0098] Las materias primas para la producción de cuero se introducen a continuación como pieles saladas. Las dosificaciones se declaran como porcentaje en peso de cuero/piel.

Remojo de eliminación de suciedad

- 40 [0099] Los cueros salados se cargan en los tambores de curtido con un 200 % de baño (agua) (10 - 25 °C) y puestos en un tambor 1 - 2 horas para eliminar sal y suciedad. Luego el baño es drenado.

Remojo

- 45 [0100] Para rehidratar los cueros y comenzar a abrir la estructura fibrosa un 150 % de baño (agua) a 10 - 25 °C se rellena en los tambores con los cueros del remojo de eliminación de suciedad. El pH se ajusta añadiendo ceniza de soda (alrededor de 0,5 %) para obtener pH 9,0 - 9,5. Para inhibir el crecimiento bacteriano son frecuentemente adicionados bactericidas también. Después de 4 horas se controla el pH y el contenido de sal en el baño. La sal debería dar un Bé entre 2 - 3, si no se introduce un paso de lavado. Dejar los tambores durante toda la noche, funcionando 10 minutos cada hora. La mañana siguiente el baño es drenado de los tambores.

50

Encalado

5 [0101] El 1,5 % de Na<sub>2</sub>S (65 % en sólido) se añade a las pieles mojadas y el tambor funciona 30 minutos mientras el sulfuro se disuelve y quema (disuelve) el pelo. Luego 30 % de agua se añade seguido de 2 % de cal. Los tambores se ejecutan 3 - 4 hrs continuamente seguidos de 5 minutos por hora durante toda la noche.

Descarnado y división

10 [0102] La mañana siguiente las pieles hinchadas sin pelo son eliminadas del tambor para ser descarnadas para eliminar tejido graso seguido de la división para obtener el espesor adecuado del grano. Las pieles (la parte del grano de las pieles sin pelo) vuelven al tambor para ser desencaladas.

[0103] Todas las dosificaciones siguientes son como pct en el peso de la piel dividida.

Desencalado

15 [0104] Después de que las pieles hayan sido cargadas en el tambor se lavan en 200 % de agua a 10 - 25 °C durante 15 minutos. El agua se drena y un baño nuevo se establece con un 35 % de agua a 20 - 25 °C., 3 % de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,5 % de NaHSO<sub>3</sub> (grado técnico). Los tambores se ejecutan 1 hora y el pH se controla cortando la piel y aplicando Fenoltaleína en el corte. La reacción debe ser incolora todo el camino a través de la transección de la piel. Si no, la serie se extiende hasta que el corte es incoloro.

20

Baño

25 [0105] Para eliminar proteínas no colagenosas se puede realizar un paso de baño de proteínas. Para el baño descalcificado un 0,01 % de 8000 LVU/g de baño (proteasa) (Ejemplos de productos de baño comerciales se pueden encontrar en la Tabla 1 de Thanikaivelan et al, 2004, Trend in Biotechnology 22,181-187). Mantener la temperatura mientras funciona el tambor de 30 minutos a 1 hora luego drenar el baño. Lavar una vez añadiendo 200 % de agua a 10 - 25 °C y ejecutar el tambor 30 minutos. Drenar.

Piquelado

30 [0106] Establecer el baño de piquelado en la piel bañada añadiendo 60 % de agua a 18 °C y 6% de NaCl. Ejecutar 15 minutos y controlar si Bé ha alcanzado >6, en caso contrario añadir NaCl adicional. Luego añadir 0,7 % de ácido fórmico y ejecutar durante 10 minutos. Después añadir 0,3 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentrado) y poner en funcionamiento el tambor 20 minutos y luego añadir un 0,3 % adicional de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dejar el tambor ejecutándose de 1,5 a 3 horas.

35

[0107] Medir el pH en la piel piquelada cortando la piel y aplicando azul de timol. Si el azul de timol es rojo, está entre pH 2 y 3; si no, añadir H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicional.

Curtido al cromo

40 [0108] Al baño de piquelado se le añade un 7,5 % de Tanchrome AB (Sisecam Chemicals Group, Estambul, Turquía) y se ejecuta 1,5 horas. Luego se añade el agente de fijación de cromo 0,4 % de Kromofix (Sisecam Chemicals Group, Estambul, Turquía) y se ejecuta 7 horas. Después del proceso de curtido, se obtiene el así llamado Wet Blue, ésta es una forma de cuero mojado estabilizado que puede ser dejada así para un tratamiento posterior.

45

**Ejemplo 3**

50 [0109] El propósito del presente ejemplo era evaluar la capacidad de la glutamil endopeptidasa (teniendo SEC ID n°: 1) del *Bacillus licheniformis* para eliminar el pelo y proporcionar la apertura de fibras sin dañar el grano en un proceso de ribera modificado.

55 [0110] Todos los porcentajes mencionados están basados en el peso de cuero/piel.

Remojo de eliminación de suciedad

60 [0111] Piezas de vaca lechera salada escocesa blanca y marrón fueron mojadas en 200 % de baño (agua) que contenía 0,1 % de Novocor S 2500 C (subtilisina, Novozymes A/S) a 25 °C en un tambor de curtido piloto. Después de 1 hora el baño fue eliminado.

Remojo modificado

65 [0112] 200 % de baño fresco (agua) a 25 °C se añadió a los cueros. Un biocida (0,01 % Myacide) fue añadido junto con 13 mg de proteína de enzima/kg de cuero de una alfa-amilasa y 0,4 % de Novocor S 2500 C (subtilisina, Novozymes A/S). El tambor se rotó continuamente durante 4 horas. Luego el baño fue eliminado.

Eliminación de pelo

5 [0113] 50 % de baño (agua) se añade a 25 °C y el pH fue ajustado con un 1 % de NaHCO<sub>3</sub> o un 1 % de solución de ácido fórmico para adecuar los valores 7,5, 8,5 o 9,5. El biocida fue también adicionado (0,01 % de Myacide). El tambor fue rotado durante 30 minutos para permitir que el pH se ajustara. La glutamil endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* se añadió (en la gama de 0 a 400 mg de enzima pura/kg de cuero) junto con una tripsina basada en proteasa como Novobate<sup>®</sup> 115 (0,01 %). El tambor fue rotado continuamente durante 4 horas. El baño fue retirado y el pelo fue retirado del sistema.

Encalado

10 [0114] Un baño nuevo fue establecido en 150 % de agua a 25 °C junto con 1,5 % de sulfuro de sodio (65 % en sólido). El tambor fue ejecutado durante 30 minutos seguido de adición de 2 % de cal apagada. El tratamiento químico tiene lugar durante toda la noche con 1 minuto de funcionamiento del tambor cada media hora.

15 Desencalado

20 [0115] La mañana siguiente el baño fue eliminado y las pieles fueron lavadas en 200 % de baño (agua) a 25 °C, dos veces durante 10 minutos. Luego se estableció un baño de desencalado añadiendo 50 % de agua a 25 °C, 3,5% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,3 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> funcionando durante 90 minutos antes de cortar y controlar el pH en las pieles (como se describe en el Ejemplo 2).

[0116] Las piezas de cuero luego fueron conservadas en formalina y analizadas respecto a la eliminación del pelo, apertura de fibra y daño del grano.

25 Evaluación del daño del grano mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

[0117] Este análisis evaluó la presencia de cualquier daño del grano en la superficie de una muestra de cuero.

30 [0118] Los wet blue obtenidos antes fueron liofilizados para eliminar toda la humedad antes del análisis.

[0119] Las muestras pequeñas (aproximadamente 5 mm x 5 mm) fueron cortadas utilizando un escalpelo y montadas en puntas de aluminio SEM usando una lengüeta adhesiva de carbono.

35 [0120] Las muestras fueron recubiertas de oro antes del análisis utilizando el SEM.

[0121] La superficie del grano fue evaluada en una ampliación de x100 y x500 para evidenciar tanto el daño del grano como la distorsión del grano de las fibras abiertas del grano.

Evaluación de la Estructura de la Fibra mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

40 [0122] Este análisis evaluó la apertura de fibras de secciones de cuero/piel.

[0123] Los wet blue antes producidos fueron liofilizados para eliminar toda humedad antes del análisis.

45 [0124] Las secciones (aproximadamente de 10 mm de largo y 2 mm de grueso) fueron cortadas utilizando una cuchilla de escalpelo y montadas en puntas de aluminio SEM usando una lengüeta adhesiva de carbono.

[0125] Las muestras fueron recubiertas de oro antes del análisis utilizando el SEM.

50 [0126] La evaluación de la estructura de fibra se efectuó usando una imagen tomada del centro de la sección transversal de la muestra en una ampliación x150.

[0127] En la evaluación se usaron características de suficiente tamaño como para separar los lotes de fibras y fibrillas junto con el ángulo de tejido de fibra.

55 Preparación de la muestra para la evaluación de eliminación del pelo a través de microscopía óptica

[0128] Este análisis evaluó la presencia de cualquier pelo restante dentro de secciones de piel.

60 [0129] Los wet blue producidos antes fueron lavados en agua destilada antes de ser seccionados en un micrótopo de congelación a 60 µm.

[0130] Las secciones finas fueron montadas sobre portaobjetos de microscopio para análisis.

65 [0131] El análisis fue conducido usando microscopía óptica de ampliación de x100 a x1000.

[0132] Fueron observadas características tales como el pelo restante en el eje capilar y la raíz capilar.





Descarnado y división

[0141] La mañana siguiente las pieles fueron descarnadas y divididas.

5 [0142] Las pieles luego fueron desescaladas, conservadas en salmuera y curtidas con cromo como se describe en el Ejemplo 2.

10 [0143] Los wet blue obtenidos por este proceso fueron analizados con respecto a la eliminación del pelo, apertura de fibras y daño del grano como se describe en el Ejemplo 3, con la adición de que las propiedades diferentes fueron valoradas como se describe abajo.

Evaluación del daño del grano mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

15 [0144] Las muestras fueron evaluadas utilizando una escala de 1 a 5:

Grado 1 - ningún daño

Grado 5 - daño significativo

20 Los grados de 1 a 3 suponen calidad aceptable del cuero.

El grado 0 es ideal.

Evaluación de la estructura de fibras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

25 [0145] Cada muestra fue luego evaluada utilizando una escala de 1 a 5:

Grado 1 - ninguna apertura

30 Grado 5 - apertura más que suficiente

[0146] La apertura aceptable es conseguida entre el grado 2 y 3.

35 [0147] la apertura ideal sería considerada con un grado de 3 a 4.

Preparación de la muestra para la evaluación de la eliminación de pelo del pelo mediante microscopía óptica

[0148] Cada muestra fue luego evaluada utilizando una escala de 1 a 5.

40 Grado 1 - sin eliminación de pelo, el pelo está completamente intacto

Grado 5 - eliminación de pelo completa, nada de pelo restante

45 El grado 3 se considera una eliminación de pelo aceptable.

[0149] La eliminación de pelo ideal se estima con un grado 4 y superior.

50 [0150] Todas las evaluaciones fueron realizadas en el cuello, el vientre y la parte extrema del wet blue, la calidad media se da en la Tabla 3.

Tabla 3

Endopeptidasa de Glu mg EP*/kg cuero	Pelo de superficie	Pelo en folículos	Raíces capilares	Daño del grano	Apertura de fibras
0	2	1	1	0,7	2
20	2,7	2	3	0,3	1
40	4	2	4	2	1
60	4,3	2,7	4,3	0,3	2,3
100	4,7	3,7	4,7	1,3	1,3
200	4,3	3	4	0,7	2,3

\*EP = proteína enzimática pura

55 [0151] De estos resultados se puede observar que una eliminación del pelo realmente buena se puede obtener con dosis de 40 mg de proteína enzimática/kg 200 mg de proteína enzimática/kg de cuero. Una eliminación de pelo significativa de pelo en los folículos es también observada con dosis de enzima de 60 mg EP/kg 200 mg EP/kg de cuero. Éste es un resultado significativo, puesto que los procesos de eliminación de pelo convencionales

frecuentemente dejan partes de pelo sin degradar detrás en los folículos. Finalmente se puede observar que el daño del grano y la apertura de fibras es aceptable.

### Ejemplo 5

5 [0152] El propósito del presente ejemplo fue evaluar la capacidad de la glutamil endopeptidasa (teniendo la SEC ID n°: 1) del *Bacillus lichenformis* para eliminar el pelo y proveer la apertura de fibras sin dañar el grano en un proceso de ribera modificado donde la eliminación de pelo concluye con un aumento gradual en pH.

10 [0153] Todos los porcentajes mencionados son en peso de cuero/piel.

#### Remojo de eliminación de suciedad

15 [0154] Cuarenta kg de ternero blanco y negro holandés salado fueron mojados en 200 % de baño (agua) con un biocida (0,01 % de Busan 30WB) a 20 °C en un tambor de curtido. Después de 1 hora la solución de baño fue eliminada.

#### Remojo modificado

20 [0155] 200 % de baño fresco (agua) a 25 °C se añadió a los cueros. Un biocida (0,01 % de Busan 30WB) fue añadido junto con 13 mg de proteína enzimática/kg de cuero de una alfa-amilasa. El tambor fue rotado continuamente durante 4 horas. Luego la solución de baño fue eliminada.

#### Eliminación de pelo

25 [0156] 100 % de baño (agua) fue añadido a 25°C junto con 0,3 % de ceniza de soda (o más para obtener pH 9,0 - 9,5) y biocida (0,01 % de Busan30WB). El tambor fue rotado durante 15 minutos para permitir ajustar el pH. La glutamil endopeptidasa de *Bacillus lichenformis* fue añadida como 60 mg de proteína enzimática pura/kg de cuero.  
30 El tambor fue rotado continuamente durante 2 horas. El debilitamiento del pelo fue observado ya 1 -1,5 hr después de la adición de la glutamil endopeptidasa. Después de 1,5 hrs el pH aumenta gradualmente a >11 mediante la adición gradual de NaOH diluido.

[0157] Después de 3 horas en total, el baño fue retirado, el pelo fue eliminado del sistema y las pieles fueron enviadas para el descarnado y la división. El tratamiento mecánico eliminó la mayor parte del pelo todavía asentado en los cueros.

#### Encalado

40 [0158] Las pieles se devuelven a un baño de 50 % de agua a 25 °C junto con 1,5 % de sulfuro de sodio (65 % en sólido) y 2 % de cal apagada. Las pieles fueron puestas en tambor continuamente durante 3 horas. Por cuestiones prácticas el tratamiento químico continuó durante toda la noche con el tambor funcionando 5 minutos cada hora. Las pieles, no obstante, resultaron estar libres de pelo ya después de 3 horas, así en principio el encalado podría ser detenido en esta fase.

45 [0159] Las pieles fueron luego desencaladas, conservadas en salmuera y curtidas con cromo como se describe en el Ejemplo 1.

[0160] Los wet blue fueron además procesados a cuero curtido crudo. El tratamiento de cuero curtido crudo es bien conocido por el experto en la técnica, un ejemplo de tratamiento de cuero curtido crudo está descrito aquí.

50 [0161] Todos los porcentajes mencionados están basados en el peso de wet blue (WB).

#### Lavado

55 [0162] El wet blue fue lavado en 300 % de agua junto con 0,2 % de ácido fórmico diluido en 25 %, dando como resultado un baño total de 325 %. El lavado fue realizado 15 minutos a 30 °C, y el baño fue eliminado.

#### Recromado

60 [0163] 150 % de agua de baño fue añadido junto con 3 % de agente de curtido inorgánico, tal como BayChrome® FD (Lanxess; Alemania) y ejecutado durante 1½ hora. El baño fue drenado y los wet blue fueron lavados 10 minutos con 200 % de agua y drenados.

#### Neutralización

65 [0164] Un baño nuevo fue establecido con 100 % agua junto con una mezcla de agentes de encalado como 2 % de

Syantan NN 555 (Smit&Zoon; Países Bajos) junto con 2 % de formiato de sodio y se ejecuta durante 20 minutos. Luego el 1 % de bicarbonato sódico y el 0,5 % de Sulfirol WS (Smit&Zoon) que es una solución de grasa basada en lanolina fueron adicionados y el proceso fue continuado durante 1½ hora.

5 [0165] El baño fue drenado y se realizó un lavado corto con 200 % de agua a 25 °C durante 10 minutos.

10 [0166] El proceso fue continuado con un baño nuevo del 70 % de agua, 2 % de Relugan RE (BASF; Alemania), un agente con retención polimérica, diluido con 25 % de agua a 30 °C antes de la adición al baño. Esta mezcla, con un volumen de baño del 95 % fue ejecutada durante 20 minutos. Luego un engrasante tal como 1,5 % de Synthol WP (Smit&Zoon) fue añadido junto con un 1 % de Densotan A polimérico (BASF). El engrasante y el polímero fueron diluidos en 25 % de agua a 30 °C antes de la adición al baño. El proceso con un volumen de baño del 120 % fue continuo durante 20 minutos.

15 [0167] El 2 % de un agente de curtido vegetal como Quebracho es añadido luego al baño junto con productos de relleno orgánicos tales como 5 % de Syntan LF 187 (Smit&Zoon) y 3 % de Syntan DF 585 (Smit&Zoon) y ejecutados durante 15 minutos. Después de añadir 2 % de Tannigan PR (Lanxess), un agente de recurtido sintético, y una cantidad deseada de tinte. Después de 1½ horas el baño fue drenado.

#### 20 Engrasante

[0168] Un baño nuevo de 100 % de agua a 60 °C fue establecido con 5 % de Synthol DS (Smit&Zoon) y 2 % de Synthol WP (Smit&Zoon) junto con 1 % de Syncotan TL (Smit&Zoon), un suavizante poliacrílico diluido junto con 25 % de agua a 60 °C antes de añadirse al baño, dando como resultado un volumen de baño total de 125 %.

#### 25 Fijación

30 [0169] Después 1 hr y 10 min. se añadió el ácido fórmico diluido (1 % de ácido fórmico en 5 % de agua) a 38 °C. Después de 30 minutos se añadió otra dosificación de la misma cantidad y nuevamente después de 30 minutos otra dosificación fue añadida pero esta vez con solo 0,5 % de ácido fórmico. El tambor fue ejecutado durante 30 minutos antes del drenaje.

[0170] Un lavado con 250 % de agua a 30 °C durante 10 minutos fue realizado antes de la fijación final.

35 [0171] Lo cual fue hecho en 150 % de agua a 35 °C esta vez con cromo tal como 3 % de Chromosal BD (Lanxess). Se ejecutó durante 1½ hora antes del lavado y del drenaje.

40 [0172] Muestras del cuello, vientre y extremo de ambas mitades del cuero curtido crudo obtenidos por este proceso fueron analizados (12 muestras en total) respecto a la eliminación del pelo, a la apertura de fibras y al daño del grano como se describe en el Ejemplo 3.

[0173] Todas las muestras han mostrado un nivel óptimo de eliminación de pelo del pelo, tanto visualmente en el grano como cuando los ejes capilares y la raíz fueron examinados en sección usando microscopía óptica. Los ejes capilares y la raíz han sido totalmente eliminados en la mayor parte de las muestras examinadas.

45 [0174] La apertura de fibras fue aceptable para la mayoría de las muestras con excepción de dos de las muestras.

[0175] Todas las muestras han mostrado alguna evidencia de daño ligero del grano. Para dos de las muestras hubo evidencia de daño más pronunciado. Esto fue previsto debido a variaciones en la calidad de la materia prima. Visualmente al cuero fue dada una puntuación de calidad alta.

50 [0176] De estos resultados se puede observar que una eliminación del pelo realmente buena se puede obtener con dosis de enzima de 60 mg de proteína enzimática/kg de cuero. Éste es un resultado significativo, puesto que los procesos de eliminación de pelo convencionales frecuentemente dejan partes de pelo sin degradar detrás en los folículos. Finalmente se puede observar que daño del grano y la apertura de fibras son aceptables.

#### 55 **Ejemplo 6**

60 [0177] El propósito del presente ejemplo fue evaluar la dosificación alta de glutamil endopeptidasa (teniendo la SEC ID n°: 1) de *Bacillus licheniformis* y la capacidad de eliminar pelo y proveer apertura de fibras sin dañar el grano en un proceso de ribera modificado bajo condiciones de producción donde la eliminación de pelo concluye con la adición de sulfuro y cal. En esta prueba la piel va a la producción estándar de curtiduría después de la división.

[0178] Todos los porcentajes mencionados están basados en el peso de cuero/piel.

#### 65 Remojo de eliminación de suciedad

[0179] 10.228 kg de salado de ternero EU fueron lavados dos veces en baño 2 x 200 % (agua) a 27 °C en uno

tambor de madera Valero. 20 minutos de tambor cada uno sin incluir el tiempo para rellenar y drenar el tambor.

Remojo modificado

5 [0180] 200 % de baño fresco (agua) a 27 °C se añadió a las pieles. Un biocida (0,15 % de Preventol ZL) fue añadido junto con 13 mg de proteína enzimática/kg de cuero de una alfa-amilasa. El tambor fue rotado continuamente durante 40 minutos (a 2 rpm). Luego la solución de baño fue eliminada íntegramente hasta quedar aproximadamente un 25 %.

10 Remojo y eliminación de pelo combinados

[0181] En el restante 25 % de baño (27 °C) otros 13 mg de proteína enzimática/kg de cuero de una alfa-amilasa fueron añadidos con el biocida (0,15 % de Preventol ZL). Rotación del tambor 30 minutos a 2 rpm. Luego la glutamil endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* fue añadida hasta 165 mg de proteína enzimática pura /kg de cuero. 15 Mientras funcionaba el tambor 60 minutos a 2 rpm el sistema de filtro capilar comenzó junto con el tambor. Después de 60 minutos se añadió un 0,1 % de solución de soda cáustica (50 %) alcanzando pH 8,9 después de 30 minutos. Luego otra dosificación de 0,1 % de soda cáustica fue añadida alcanzando pH 9,5 después de 30 minutos. Se añadió (para mejorar filtración) un tambor de 90 minutos para permitir la eliminación de pelo de grado alto antes de más baño (30 %) y continuó 120 minutos. La inspección de los cueros después de dos horas reveló una eliminación de pelo estimada de > 90 %.

[0182] El tambor fue drenado íntegramente (<30 % 27 °C) y el filtro fue desconectado. Luego 1,3 % de polvo Na<sub>2</sub>S (67 %) se añadió a las pieles dejando quemar el pelo restante durante 30 minutos a 2 rpm. Después 1,3 % de Ca(OH)<sub>2</sub> fue añadido. Se permitió que el tambor funcionara 60 minutos de aquí en adelante un 40 % de agua fue añadido y después de 60 minutos otro 30 % de agua fue añadido. El tambor luego fue puesto automático durante toda la noche a 1 rpm 5 min/25 min pausa. La siguiente mañana el tambor fue vaciado y las pieles fueron descarnadas y divididas.

30 [0183] Las pieles fueron desescaladas luego, piqueladas y curtidas con cromo según las recetas estándar de la curtiduría.

[0184] Después del curtido al cromo las 400 unidades de wet blue fueron inspeccionadas. Todas mostraron un nivel óptimo de eliminación del pelo sin presentar raíces de pelo o ejes.

35 [0185] Todas las piezas WB tanto de la enzima como de la producción estándar se llevaron al piloto para ser convertidas en tres artículos diferentes de cuero curtido crudo. Un tipo superior de zapato negro acordonado, un tipo blando semivegetal y un tipo superior blando nubuck de zapato. Se determinaron las resistencias a rotura para los artículos preparados. La "conclusión" de la columna indicó la evaluación total de los artículos curtidos crudos producidos:

40

Tabla 4

Artículo curtido crudo	Promedio de espesor (mm)	Longitud de la resistencia al desgarramiento (N)	Anchura de la resistencia al desgarramiento (N)	Conclusión
Producción Blanda Semi Veg Estándar	1,4	68	71,8	OK
Producción Blanda Semi Veg de enzima	1,4	63	76,6	OK
Producción celeste nubuck estándar	1,4	100	104,4	OK
Producción celeste nubuck de enzima	1,4	69	68,2	OK
Producción estándar negra molida	1,1	41	40,0	OK
Producción de enzima negra molida	1,0	54	45,0	OK

45 [0186] De estos resultados se puede observar que una eliminación del pelo óptima se obtuvo utilizando el método de producción de enzima y los artículos curtidos crudos satisfactorios se formaron con las pieles preparadas.

**Ejemplo 7**

50 [0187] El propósito del presente ejemplo fue demostrar el rendimiento de la eliminación de pelo de cuatro glutamil endopeptidasas diferentes, dos de *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID n°: 1 o la SEC ID n°: 4), *Bacillus pumilus* JA96 (teniendo la SEC ID n°: 2) y *Streptomyces griseus* (teniendo la SEC ID n°: 8).

[0188] Se descubrió que las glutamil endopeptidasas de *Bacillus licheniformis* con la SEC ID nº: 4 y de *Streptomyces griseus* tenían glutamil endopeptidasa en proporciones de 420 y 65700 respectivamente, usando el método descrito en el Ejemplo 1.

5 [0189] El cuero de piel de vaca holandesa salado fue lavado en agua del grifo fría y cortado en piezas de 20 mm por 300-600 mm. Las piezas de cuero de piel de vaca fueron mojadas en 250 mM de tampón de NaOH de glicina durante 2 h. Después de esta incubación, la grasa y los tendones fueron quitados de las piezas de cuero y las piezas de cuero de piel de vaca fueron pesadas. En cada prueba, ocho piezas diferentes de cuero de piel de vaca fueron tratadas enzimáticamente en dos frascos de 500 ml de Erlenmeyer en tampón de 250 mM de NaOH de glicina a 130 rpm, 9 pH y 26°C durante 20 h. Glutamil endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID nº: 1), *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID nº: 4) *Bacillus pumilus* JA96 y *Streptomyces griseus* fueron usadas en el estudio. El rendimiento de cada glutamil endopeptidasa fue evaluado en tres experimentos diferentes (es decir, 24 piezas diferentes de cuero de piel de vaca fueron enzimáticamente tratadas en total). El control negativo fue tratado de la misma manera pero sin adición de enzima. Después de 20 h de incubación, la eficiencia de la eliminación de pelo fue evaluada usando escalas elásticas (60, 600 y 2500 g, Kern & Sohn, GmbH, D-72336, Ballinge). Las piezas de cuero de piel de vaca fueron montadas en las placas de prueba y 5 mm por 10 mm de pelo de las piezas de cuero de piel de vaca fueron fijados usando una horquilla. La escala elástica fue luego conectada a la horquilla fijada y tirada hacia arriba. La eliminación de pelo eficaz fue medida en gramos y la fuerza de eliminación de pelo requerida fue calculada multiplicando el peso medido (en kg) con 9,81 m/s<sup>2</sup>.

20 [0190] Las propiedades de eliminación de pelo de glutamil endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID nº: 1), *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID nº: 4) *Bacillus pumilus* JA96 y *Streptomyces griseus* se muestran en la Tabla 5. El control negativo requirió una fuerza significativamente más alta de eliminación de pelo (13 N) que las piezas de cuero enzimáticamente tratadas (0.5-0.8 N) (Tabla 5). La eliminación del pelo completa fue conseguida con las piezas de cuero tratadas con glutamil endopeptidasa mientras que el pelo de control negativo frecuentemente se rompió cuando la fuerza apropiada fue aplicada. Una dosificación de enzima más alta de glutamil endopeptidasa de *Streptomyces griseus* fue requerida para alcanzar el mismo efecto de eliminación de pelo que la glutamil endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID nº: 1), *Bacillus licheniformis* (teniendo la SEC ID nº: 4) y *Bacillus pumilus* JA96 (Tabla 5).

30 Tabla 5. Eficiencia de eliminación de pelo de las piezas de cuero tratadas con glutamil endopeptidasa. La tabla muestra los valores medios de tres experimentos diferentes (es decir, valor medio de 24 piezas de cuero). Las fuerzas de eliminación de pelo se dan en Newton.

GLUTAMIL ENDOPEPTIDASA	DOSIFICACIÓN DE ENZIMA (MG EP/KG CUERO)	FUERZA DE ELIMINACIÓN DE PELO (N)
CONTROL NEGATIVO	0	13
<i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> (SEC ID Nº: 1)	50	0,8
<i>STREPTOMYCES GRISEUS</i> (SEC ID Nº: 8)	500	0,5
<i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> (SEC ID Nº: 4)	50	0,8
<i>BACILLUS PUMILUS</i> JA96 (SEC ID Nº: 2)	50	0,8

## REIVINDICACIONES

1. Método para debilitar el pelo en pieles que comprende el tratamiento de cueros o pieles con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, donde el pH de la solución está en la gama de 5,5 a 12,5, preferiblemente en la gama de 6 a 12, más preferiblemente en la gama de 6,5 a 11, más preferiblemente en la gama de 7 a 10, más preferiblemente en la gama de 7,5 a 9,5, de la forma más preferible en la gama de 8 a 9.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde el tratamiento de glutamil endopeptidasa se realiza en el margen de pH de 5,5 a 10, seguido de un aumento gradual en pH hasta por encima de 11.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tratamiento de glutamil endopeptidasa es realizado entre 1 y 5 horas, preferiblemente entre 1,5 y 4 horas, más preferiblemente entre 2 y 3 horas y de la forma más preferible entre 1,5 y 2,5 horas.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tratamiento se realiza en presencia de una proteasa, preferiblemente de una serina proteasa (EC 3.4.21).
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, donde el tratamiento se realiza con glutamil endopeptidasa como la única fuente de actividad de proteasa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la glutamil endopeptidasa tiene una proporción de glutamil endopeptidasa de al menos 10.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la glutamil endopeptidasa es derivada de una bacteria del género Bacillus.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la glutamil endopeptidasa es seleccionada entre polipéptidos con actividad de glutamil endopeptidasa y que comprende una secuencia con al menos 60 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 65 %, más preferido al menos 70 %, más preferido al menos 75 %, más preferido al menos 80 %, más preferido al menos 85 %, más preferido al menos 90 %, más preferido al menos 95 %, más preferido al menos 96 %, más preferido al menos 97 %, más preferido al menos 98 %, más preferido al menos 99 % de identidad con la secuencia al polipéptido maduro de una de SEC ID n°: 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8.
- 30 10. Proceso para eliminación de pelo de cueros o de pieles que incluye los pasos:
- 35 a) tratar cueros con una cantidad eficaz de alfa-amilasa en una solución acuosa; y  
b) debilitar el pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa.
- 40 11. Proceso según la reivindicación 10, donde el tratamiento de alfa-amilasa en el paso a) se realiza en entre 1 y 6 horas.
- 45 12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 11, donde el tratamiento de alfa-amilasa en el paso a) es un paso de remojo.
13. Proceso según la reivindicación 12, donde el remojo se realiza entre 1 y 5 horas, preferiblemente entre 1,5 y 5 horas, incluso más preferiblemente entre 1 y 4 horas, y de la forma más preferible alrededor de 2 -3 horas.
- 50 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 13 donde el tratamiento de alfa-amilasa en el paso a) se realiza en la presencia de una proteasa, preferiblemente de una serina proteasa (EC 3.4.21).
15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 14, donde el debilitamiento de pelo en el paso b) se realiza según cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 8.
- 55 16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 15, donde la piel obtenida después del paso b) según la reivindicación 10 es sometida a un tratamiento sulfúrico o tratamiento con un compuesto de reducción de disulfuro de proteína alternativa.
- 60 17. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 16 donde la piel obtenida después del paso b) se descarna y divide antes del tratamiento con sulfuro o un compuesto de reducción de disulfuro de proteína alternativa.
18. Método según la reivindicación 16 o 17, donde el sulfuro se usa en la gama de 0,1 % a 1.5 % por kg de piel.
- 65 19. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de 16 a 18, donde el tratamiento sulfúrico se realiza en combinación con un agente de encalado.

20. Método según la reivindicación 19, donde el agente de encalado se usa en la gama de 0,1 % a 2,5 % por kg de piel.
- 5 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 15, donde el pelo es debilitado o eliminado sin el uso de sulfuro.
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 15 o 21, donde el pelo es debilitado o eliminado sin ningún agente de encalado.
- 10 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 22, donde la piel obtenida después del paso b) según la reivindicación 10 es sometida a un paso mecánico de eliminación de pelo.
24. Proceso para preparar un wet blue que comprende los pasos siguientes:
- 15 a) un remojo para eliminar la suciedad;  
b) un remojo que comprende una alfa-amilasa y potencialmente una proteasa;  
c) eliminación de pelo con una cantidad eficaz de glutamil endopeptidasa en una solución acuosa;  
d) descarnado y división de la piel obtenida en c)  
e) desencalado; y
- 20 f) piquelado y curtido.
25. Proceso según la reivindicación 24, donde un tratamiento con un agente de encalado y/o sulfuro y/o o un compuesto de reducción de disulfuro de proteína alternativa es introducido bien antes del paso d) o después del paso d).