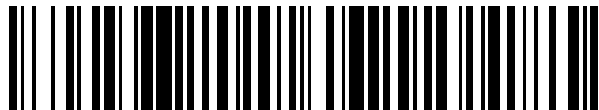


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 646**

51 Int. Cl.:

**C11D 3/386** (2006.01)

**C14C 1/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2008 E 08735967 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2132292**

54 Título: **Tratamiento enzimático para el desengrasado de pieles y pellejos**

30 Prioridad:

**09.04.2007 US 910702 P**

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

**14.01.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RASMUSSEN, LARS;  
XU, QING;  
PEDERSEN, NIELS KILDEGAARD y  
ZHOU, ZHIWEI**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 526 646 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**

Tratamiento enzimático para el desengrasado de pieles y pellejos

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere al uso de lipasa para desengrasar pieles y pellejos durante la transformación de pieles y pellejos en cuero. Más específicamente, la lipasa se puede usar en pasos varios durante el proceso de curtiduría con pH 6-13 con o sin otros productos químicos o surfactantes.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] Pieles y pellejos contienen regiones de grasa natural. No obstante, el exceso de grasa necesita reducirse durante el proceso de fabricación de cuero para conseguir un resultado satisfactorio del producto de cuero final.

15

[0003] El desengrasado de pieles y pellejos es actualmente realizado usando solventes orgánicos y surfactantes.

[0004] Recientemente se ha sugerido el uso de enzimas lipolíticas para mejorar el desengrasado de pieles y pellejos, reduciendo o incluso evitando así el uso de surfactantes o bien como un sustituto para solventes orgánicos, particularmente una lipasa derivada de *Humicola lanuginosa* (EP 258068 y EP 305216) vendida bajo la marca registrada GREASEX® (producto de Novozymes A/S). WO 00/60063 describe varias variantes de esta lipasa *Humicola lanuginosa* y su uso en detergentes, no obstante su uso para el desengrasado en la industria del cuero no se menciona.

20

[0005] Cuando se comparan con métodos tradicionales, los procesos de desengrasado enzimático generalmente mejoran la calidad del cuero final, reducen el uso de productos químicos y reemplazan productos químicos que tienen un efecto adverso en el entorno.

25

[0006] Las enzimas lipolíticas hidrolizan grasas en mono y diglicéridos, ácidos libres de grasa y glicerol. El desengrasado de lipasa ha sido mencionado en condiciones de pH desde ácido hasta alcalino. No obstante, la lipasa surte efecto en el sistema emulsionado, pero resulta menos eficaz en una solución de una fase que contiene más del 50% de agua, por lo tanto el uso de lipasa específica, que da buen efecto en el sistema de agua sin adición de ningún surfactante o bien mantiene el uso de surfactante en el grado mínimo, es un problema difícil y resolver este problema dará muchas ventajas. Además, si la lipasa se puede usar tanto en condición alcalina como neutral a la condición ácida (de pH 6-13) en pasos varios puede dar otras ventajas reduciendo y seleccionando productos químicos y surfactantes de manera óptima.

30

35

[0007] Hay una siempre existente necesidad de suministrar lipasas nuevas con propiedades de desengrasado mejoradas en una variedad de procesos de fabricación de cuero.

40

**RESUMEN DE LA INVENCION**

[0008] Los inventores han descubierto que variantes determinadas de la lipasa de tipo salvaje *Humicola lanuginosa* (estas variantes han sido descritas en WO 00/60063) tienen un rendimiento de desengrasado particularmente bueno en la producción de cuero. Estas variantes de lipasa se pueden usar para el desengrasado en ausencia de surfactantes.

45

[0009] Por consiguiente, la presente invención proporciona un proceso para el desengrasado enzimático de pieles y pellejos, que comprende tratamiento enzimático con ciertas variantes de lipasa de tipo salvaje *Humicola lanuginosa* en una solución acuosa bajo pH 6-13.

50

[0010] El proceso de la presente invención mejora la propiedad de desengrasado y reduce el uso de otros productos químicos y surfactantes al máximo.

**55 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

[0011] La presente invención es posteriormente ilustrada con referencia a los dibujos anexos, donde:

La Fig. 1 muestra los ácidos grasos y el análisis de triglicéridos por HPLC después del paso de desengrasado con tratamiento EUSAPON® OD 4%.

60

La Fig. 2 muestra los ácidos grasos y el análisis de triglicéridos por HPLC después del paso de desengrasado con el tratamiento de piel mojada con lipasa 200 LU/kg.

La Fig. 3 muestra los ácidos grasos y el análisis de triglicéridos por HPLC después del paso de desengrasado con el tratamiento de piel mojada con lipasa 100 LU/kg.

65

La Fig. 4 muestra los ácidos grasos y el análisis de triglicéridos por HPLC después del paso de desengrasado con tratamiento en blanco. Explicación de los picos en las Figuras 1-4:

El valor máximo en 5.780 min indica el ácido palmítico; los picos en 14-20 min indican varios triglicéridos, entre ellos, 17.7-18 min es el valor máximo de trioleato; los picos en 20.71-21.4 min son picos solventes.

La Fig.5: Cromatograma HPLC del extracto de piel en el ejemplo 3.

La Fig.6: Cromatograma HPLC del extracto de piel en el ejemplo 4.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] La presente invención proporciona un método para la transformación de pieles o pellejos en cuero, el cual consiste en un tratamiento enzimático de la piel o pellejo con unas lipasas determinadas.

### La transformación de pieles o pellejos en cuero

[0013] Las pieles y pellejos son normalmente recibidos en las curtidurías en forma de pieles o pellejos salados o secos en bruto. La transformación de pieles o pellejos en cuero comprende diferentes pasos de proceso incluyendo los pasos de remojo, pelado, encalado, desenclado, baño de mordiente, solución de decapado y curtido. Estos pasos constituyen el tratamiento mojado y se realizan en la curtiduría. El tratamiento enzimático según la presente invención puede tener lugar en los pasos de pH dentro de 6-11 durante la producción de cuero. No obstante, los desengrasados de lipasa de la presente invención son normalmente utilizados durante el tratamiento mojado, es decir, durante el remojo, pelado, baño de mordiente y/o decapado.

[0014] Los procesos para la producción de cuero son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y se han descrito en, por ejemplo, WO 94/06942, WO 90/12118, Patente de EE.UU. n.º 3,840,433, EP 505920, GB-A 2233665 y Patente de EE.UU. n.º 3,986,926.

### Desengrasado enzimático

[0015] El proceso de la presente invención se puede aplicar a cualquier piel o pellejo usado de forma convencional para la fabricación de cuero. En particular, el proceso de la invención se puede aplicar a pieles ovinas, pieles porcinas, pieles bovinas, o pieles cabrunas.

[0016] El desengrasado enzimático según la presente invención puede tener lugar en los pasos de pH dentro de 6-11 durante la producción del cuero, bien como un paso separado o como parte de un paso de tratamiento de cuero existente. No obstante, el proceso preferiblemente tiene lugar durante, o entre, los pasos del proceso que se realizan con un pH 6-13 para evitar así un ajuste de pH innecesario y que requiere mucho tiempo.

[0017] El proceso de la presente invención se realiza con pH 6-13. El proceso es preferiblemente realizado con un pH en la gama de aproximadamente pH 7-11. En su forma de realización más preferida el proceso de la invención se realiza con un pH en la gama de aproximadamente pH 8-11.

[0018] El proceso de la invención para el desengrasado enzimático tiene lugar durante uno o más de los pasos posteriores de remojo, pelado, encalado, desenclado, baño de mordiente y decapado. En un proceso de fabricación de cuero, el paso de remojo generalmente tiene lugar en la gama de pH 8-9, pelado con un pH de 9-13, desenclado con un pH de 8-13 y baño de mordiente alrededor de pH 8. Para el paso de solución de decapado, a principios del paso, el pH es aproximadamente 8, y al final de este paso, el pH cae hasta aproximadamente 2. En una forma de realización preferida, el desengrasado enzimático tiene lugar en el paso de baño de mordiente o en la fase del principio del paso de decapado.

[0019] En otra forma de realización preferida, el proceso de la invención para el desengrasado enzimático tiene lugar como un paso separado, realizado durante cualquier periodo de tiempo después de que el remojo, pelado, encalado, desenclado, baño de mordiente o decapado haya sido finalizado. Al final del paso de decapado, el pH de la mezcla reactiva está normalmente en la gama de pH 1-3 (alrededor de pH 2). Cuando el proceso de la invención tiene lugar durante el paso de decapado, habrá un intervalo de tiempo para la enzima para producir su efecto bajo pH 6-8 (por ejemplo; 7) durante 1-1.5 horas. Habrá algunas ventajas para el desengrasado enzimático durante el paso de decapado debido a que la estructura de la piel ha sido abierta por otros productos químicos o tratamientos enzimáticos en el paso anterior, y esto hace más fácil a la lipasa penetrar en la piel y producir su efecto. Por otro lado, si la lipasa se añade en los pasos anteriores, las ventajas son más tiempo y óptimo pH para la lipasa para producir su efecto, aunque la penetración de la lipasa es peor que si se añade en el paso de encurtido.

[0020] El proceso de la invención se puede realizar a temperaturas normalmente empleadas en los procesos de fabricación de cuero, es decir, en el rango de aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 65°C, o incluso hasta aproximadamente 75°C. Dependiendo, entre otras cosas, de la piel en cuestión, la temperatura preferiblemente se

mantiene en el rango de aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 40°C (en particular cuando se aplica a pieles ovinas), o en el rango de aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 40°C (en particular cuando se aplica a pieles bovinas).

## 5 Tratamiento enzimático de pieles y pellejos

[0021] En un proceso según la presente invención para el desengrasado enzimático de pieles y pellejos, la piel o pellejo se trata con una lipasa en un medio de reacción acuosa, para hidrolizar las grasas presentes en la piel o pellejo.

[0022] El desengrasado con la lipasa de la presente invención funciona bien en ausencia de surfactantes. Cuando el surfactante se usa, el surfactante es preferiblemente un aniónico, un no iónico, o un surfactante de tipo anfótero, o una mezcla de estos. Por otra parte, los solventes orgánicos pueden estar presentes durante el tratamiento lipolítico, pero no se necesitan solventes orgánicos en el proceso de la invención. Por lo tanto, por interés medioambiental, la mezcla reactiva debería ser libre de solventes orgánicos.

[0023] El tiempo de reacción depende inmensamente de la exigencia del proceso, básicamente las lipasas trabajan bien bajo la mayoría de las condiciones del proceso en la curtiduría. Para cuestiones prácticas, se contempla un tiempo de reacción en el rango de 30 minutos hasta 24 horas. Preferiblemente el tiempo de reacción está en el rango de 0.5-16 horas, más preferido 0.5-4 horas, el más preferido 0.5-2 horas.

[0024] Cuando la hidrólisis tiene lugar, los productos de hidrólisis son formados. Estos productos reactivos deberían ser eliminados de las pieles y pellejos.

[0025] Los productos de hidrólisis se pueden eliminar separando las pieles y pellejos del medio de reacción acuoso. Preferiblemente las pieles y pellejos son posteriormente lavadas reiteradamente con agua. En caso que el proceso tenga un pH más alto (por ejemplo; pH>11), la saponificación ocurrirá automáticamente con los ácidos grasos formados por la lipasa y por lo tanto para producir jabones ayudando a la emulsión de la grasa y los ácidos grasos sin añadir más surfactantes externos. Por lo tanto el uso de tal lipasa reducirá el uso de surfactantes al máximo.

[0026] El agente tensoactivo usado en una mezcla acuosa para la eliminación de los productos de hidrólisis puede ser cualquier surfactante convencional. Sin embargo, se prefieren los surfactantes de tipo aniónico, no iónico y anfótero, ya sea como surfactantes separados o mezclados.

## 35 Lipasa

[0027] La lipasa de referencia usada en esta invención es la lipasa de tipo salvaje *Humicola lanuginose* derivada de la variedad *Humicola lanuginose* DSM 4109. Se ha descrito en EP 258068 y EP 305216 y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la posición 1-269 de SEQ ID NO: 2 de Patente de EE.UU. n.º 5,869,438. En esta especificación, la lipasa de referencia se muestra como aminoácidos 1-269 de SEQ ID NO: 1 de la presente invención.

[0028] Las variantes de esta lipasa *Humicola lanuginose* y su uso en el detergente ya han sido mencionadas en WO 00/60063.

[0029] Las lipasas variantes por supuesto tienen actividad de la lipasa y muestran buen efecto en el desengrasado en la producción de cuero. Las lipasas constan de sustituciones conservadoras, inserciones, supresiones, extensiones de terminal N, y/o extensiones de terminal C, al igual que fragmentos de lipasa en comparación con la secuencia de aminoácidos 1-269 de SEQ ID NO: 1 se pueden obtener a partir de esta molécula por cualquier método conocido en la técnica, tal como mutagénesis específica, mutagénesis aleatoria, procesos de derivación de consenso (EP 897985), y transposición de genes (WO 95/22625, WO 96/00343), etc.

[0030] Los cambios de aminoácidos permitidos para la lipasa variante son mínimas, es decir las sustituciones de aminoácidos conservadores o las inserciones que significativamente no afectan el plegado y/o la actividad de la proteína, preferiblemente un número pequeño de tales sustituciones o inserciones; supresiones pequeñas; pequeñas extensiones carboxilo-terminal o amino-terminal, etc. En el contexto anterior, el término "pequeño" independientemente designa a un número de hasta 25 residuos de aminoácidos. En formas de realización preferidas, el término "pequeño" independientemente designa hasta 24, 23, 22, 21, o hasta 20 residuos de aminoácidos. En formas de realización preferidas adicionales, el término "pequeño" independientemente designa hasta 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, o hasta 10 residuos de aminoácidos. En otras formas de realización preferidas, el término "pequeño" independientemente designa hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o hasta 1 residuo de aminoácido.

[0031] La lipasa variante de la invención ha sido derivada de una lipasa parental de aminoácidos 1-269 de SEQ ID NO: 1 por sustitución doble de T231 R y N233R.

[0032] La nomenclatura que aquí se usa para mutaciones de definición es esencialmente como se describe en WO 92/05249. Así, T231R indica una sustitución de T en la posición 231 con R.

5 [0033] La lipasa de la invención se puede aplicar en concentraciones empleadas de forma convencional en los procesos de desengrasado. La lipasa se puede añadir en una cantidad de 10 a 600 KLU por kg de piel o pellejo, preferiblemente de 50 a 400 KLU por kg de piel, de forma más preferible de 100 a 300 KLU por kg de piel.

#### Composición de desengrasado de cuero

10 [0034] La lipasa de la presente invención se puede usar junto con surfactante en el desengrasado. Adicionalmente, la composición puede comprender otra enzima y otros componentes usados de forma convencional en la industria del cuero.

15 [0035] La composición de desengrasado del cuero según la invención puede ser en líquido, pasta, gel, barras o de forma granulosa.

20 [0036] La lipasa de la invención, u opcionalmente otro enzimático incorporado en la composición de desengrasado del cuero es normalmente incorporado en la composición a un nivel de 0,00001% a 3% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de 0,001 % a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, de forma más preferible a un nivel de 0,01 % a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso de forma aún más preferible a un nivel de 0,1% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición.

#### Sistema surfactante

25 [0037] El sistema de surfactante puede comprender surfactantes no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfótilico, y/o zwitteriónico. Como se ha descrito anteriormente, las variantes de lipasa de la invención son particularmente adecuadas para el desengrasado de cuero y comprenden una combinación de surfactante no iónico y aniónico con 0- 40% en peso de surfactante aniónico y 60-100% en peso de no iónico, especialmente 0-30% de surfactante aniónico y 70-100% no iónico. Tal como también se describe, algunas lipasas preferidas de la invención son también adecuadas para el desengrasado de cuero y comprenden 20-30% de surfactante aniónico y 70-80% de surfactante no iónico.

35 [0038] El surfactante está típicamente presente a un nivel de 0,1 % a 60% en peso de composición, por ejemplo, del 1% al 40%, especialmente del 3% al 30%, preferiblemente de 10-30%, de forma más preferible desde aproximadamente el 12% hasta aproximadamente el 25% en peso. Algunos ejemplos de surfactantes son descritos abajo.

#### Surfactantes aniónicos

40 [0039] Los surfactantes aniónicos preferidos incluyen sulfato de alquil, alquil epoxi sulfato, sulfonato de benceno de alquil lineal y mezclas de estos.

45 [0040] Los surfactantes de sulfato de alquilo son sales hidrosolubles o ácidos de la fórmula  $ROSO_3 M$  donde R es preferiblemente un hidrocarbilo  $C_{10} - C_{24}$ , preferiblemente un alquilo o hidroxialquil con un componente de alquilo  $C_{10} - C_{20}$ , de forma más preferible un alquilo o hidroxialquil  $C_{12} - C_{18}$ , y M es H o un catión, por ejemplo, un catión de metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio, litio), o amonio o amonio sustituido.

50 [0041] Los sulfonatos de alquilbenceno son adecuados, especialmente los sulfonatos de benceno de alquilo lineales (cadena lineal) (LAS) donde el grupo alquilo contiene preferiblemente de 10 a 18 átomos de carbono.

55 [0042] Los surfactantes aniónicos adecuados incluyen sulfatos alcoxilados de alquilo que son sales hidrosolubles o ácidos de la fórmula  $RO(A)_m SO_3M$  donde R es un alquilo no sustituido  $C_{10} - C_{24}$  o grupo de hidroxialquilo con un componente de alquilo  $C_{10} - C_{24}$ , preferiblemente un alquilo o hidroxialquilo  $C_{12} - C_{20}$ , de forma más preferible alquilo o hidroxialquilo  $C_{12} - C_{18}$ , A es una unidad de propoxi o etoxi, m es mayor de cero, típicamente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 6, de forma más preferible entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3, y M es H o un catión que puede ser, por ejemplo, un catión metálico (por ejemplo, sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, etc.), amonio o catión de amonio de sustituido. Los sulfatos de alquilo etoxiló al igual que los sulfatos de alquilo propoxiló son contemplados aquí. Ejemplos específicos de cationes de amonio sustituido incluyen cationes de metil-amonio, dimetil-amonio, trimetil-amonio y cationes de amonio cuaternario tal como tetrametil-amonio y cationes de piperdinio de dimetil y aquellos derivados de alquilaminas tal como etilamina, dietilamina, trietilamina, mezclas derivadas, y similares.

65 [0043] Otros surfactantes aniónicos incluyen sales (incluyendo, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, y sales amónicas sustituidas tal como sales de mono-, di- y trietanolamina) de jabón, alcanosulfonatos secundarios o primarios  $C_8 - C_{22}$ , olefinsulfonatos  $C_8 - C_{24}$ , ácidos policarboxílicos sulfonatados preparados por sulfonación del producto pirolizado de citratos de metal alcalinotérreo.

Surfactante no iónico

5 [0044] El surfactante puede comprender óxido de polialquileo (por ejemplo, óxido de polietileno) condensados de alquil fenoles. El grupo alquilo puede contener aproximadamente de 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, en una cadena lineal o cadena ramificada. El óxido de etileno puede estar presente en una cantidad igual aproximadamente de 2 hasta aproximadamente 25 moles por mol de fenol de alquilo.

10 [0045] El surfactante también puede comprender productos de condensación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios con aproximadamente 1 hasta aproximadamente 25 moles de óxido de etileno. La cadena de alquilo del alcohol alifático puede ser bien recta o ramificada, y contiene generalmente aproximadamente de 8 a aproximadamente 22 átomos de carbono.

15 [0046] Además, el surfactante no iónico puede comprender condensados de óxido de polietileno de alquil fenoles, productos de condensación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios con aproximadamente de 1 a aproximadamente 25 moles de óxido de etileno, alquilpolisacáridos, y mezclas de estos. Los más preferidos son etoxilatos de fenol de alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> que tienen de 3 a 15 grupos etoxi y etoxilatos de alcohol C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> (preferiblemente C<sub>10</sub> avg.) que tienen de 2 a 10 grupos etoxi, y mezclas de estos.

20 [0047] Los agentes tensoactivos no iónicos preferidos son alcohol etoxilato, fenol alcohólico, etoxilato amida de ácido graso de polihidroxi, poliglucósido de alquilo y mezclas de estos. El ejemplo disponible comercialmente de surfactante no iónico es EUSAPON® OD, Lutensol® ON60 o Neodol® 25-7.

Actividad lipolítica

25 [0048] La actividad lipolítica se puede determinar utilizando tributirina como sustrato. Este método se basa en la hidrólisis de tributirina por la enzima, y el consumo de álcali se registra como función de tiempo.

30 [0049] Una unidad de lipasa (LU) es definida como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir, a 30°C; pH 7,0; con Gum Arabic como emulsionante y tributirina como sustrato) libera 1 micro mol de ácido butírico titratable por minuto.

**EJEMPLOS**

35 [0050] La invención es posteriormente ilustrada con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden de ninguna manera limitar al ámbito de la invención como se afirma.

**Ejemplo 1: desengrasado enzimático de piel de oveja**

40 [0051] Este ejemplo demuestra el proceso de la invención como se aplica a la piel de oveja doméstica de Inglaterra conservada en salmuera. La piel fue sometida al tratamiento de lipasa con una variante de lipasa de dos sustituciones T231 R+N233R en SEC ID NO: 1 (obtenido según WO 00/60063).

45 [0052] **Extracción de grasa y prueba de contenido de grasa:** después de acabar la prueba de desengrasado, las piezas de piel fueron recogidas y enjuagadas en agua durante 2 min, luego secadas en un horno a 40°C durante toda la noche. Las pieles secas fueron pesadas y extraídas mediante CHCl<sub>3</sub> del equipamiento SOXTECH™ (disponibles en FOSS Company), mojadas durante 50 min, extraídas durante 180 min a 120°C, el tiempo de recuperación de solvente fue 50 min. El contenido de grasa fue calculado como la pérdida de peso después de la extracción.

50 [0053] **Análisis de ácidos grasos y triglicéridos mediante HPLC:** fue usado el módulo de separaciones de Waters 2690 que incluye un sistema de gradiente de solvente cuatro y LiChrosfer 100RP-8 con columna con el extremo encapsulado (5µm) (Merck). Una elución de solvente de trigradiente que incluye HCN, 0.1% AcOH en el agua y CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub> /HCN fue usada para separar FA (ácidos grasos), y TG (triglicéridos). Ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico y estándares de trioleato se usan de 0.2-1.0 mg/ml para calcular la formación de ácidos grasos y residuos TG en los extractos CHCl<sub>3</sub>. Las figuras 1-4 dieron los gráficos HPLC.

55 [0054] El trioleato de residuo: el trioleato es un triglicérido que contiene tres ácidos oleicos idénticos en cada uno de los enlaces éster. Ya que es el TG que aparece más ampliamente en la piel animal, esto se puede usar como un índice para ver el grado de desengrasado.

60 [0055] El ácido palmítico: este es uno de los tipos de ácido graso popular que existen en la piel animal, debido a que el ácido oleico tiene punto de fusión inferior, este puede entrar en la solución de lavado durante el desengrasado y el proceso siguiente, por lo tanto la mayor parte de los ácidos grasos restantes dejados en la piel de oveja son ácidos grasos de punto de fusión alto, y el ácido palmítico es uno de éstos. Se mide para indicar la formación de ácidos grasos en la piel de oveja.

65

[0056] **Los pasos de desengrasado:** la piel de oveja doméstica de Inglaterra conservada en salmuera de material crudo, fue cortada en 1\*1 cm desde posiciones de grasa baja y piezas de 0,5\*0,5 cm de lugares con mucha grasa (hombro, cuellos y nalgas), total de 40 g de mezcla en cada vaso de precipitado LOM, se añadieron cuatro bolas de acero en el vaso de precipitado LOM para aumentar la fuerza mecánica. Las condiciones de desengrasado se muestran en la Tabla 1.

5

Tabla 1

Proceso	Piel (g)	Tampón químico (ml)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desengrasado	40 g	50 ml	7	30	60
Saponificación			12	30	60
Drenaje					
Lavar las piezas de piel en agua corriente					2
El tampón químico contiene 8% del peso NaCl i 4% del peso NaHCO <sub>3</sub> .					

[0057] El ejemplo se efectuó como cinco grupos de prueba ejecutándose en paralelo (ver grupo 1-5 de la Tabla 2). El surfactante o lipasas fueron añadidos en el búfer químico según la Tabla 2 en el paso de desengrasado para cada uno de los ensayos de comparación. Las Figuras 1-4 han mostrado el gráfico HPLC de los experimentos de los grupos 1, 2,3 y 5 respectivamente.

10

[0058] Entre estos, EUSAPON<sup>®</sup> OD 4% fue usado en un método de desengrasado industrial estándar. Blanco fue solo tampón químico. No tratada fue la piel conservada en salmuera original sin ningún tratamiento de desengrasado utilizado como una comparación.

15

Tabla 2

Grupo n.º	Tratamiento	% de grasa (extracción de CHCl <sub>3</sub> en piel desengrasado)	Residuo de Trioleato (mg/ml por HPLC)	Residuo de ácido palmítico (mg/ml por HPLC)
1	EUSAPON <sup>®</sup> OD 4%	14.5	15.2	0
2	Lipasa 200 KLU/kg piel mojada	6.7	No se puede detectar	0
3	Lipasa 100 KLU/kg piel mojada	8.2	<0.2	16.4
4	EUSAPON <sup>®</sup> OD 4%(repetido)	14.1	13.6	0
5	En blanco	15.5	16.4	0
6	No tratado	19.0	17.8	0

[0059] El % de grasa fue calculado según la pérdida de peso en la extracción CHCl<sub>3</sub>, esto puede ser tanto FA o TG o DG (diglicéridos) o MG (monoglicéridos) o sus combinaciones. El % de grasa que permaneció en la piel después del tratamiento de lipasa fue del 6.7% (grupo 2) o 8.2% (grupo 3), mientras el % de grasa que permaneció después del tratamiento del surfactante Eusapon de OD 4% fue más del 14%. Esto indica que el efecto de desengrasado de la lipasa de la presente invención fue mucho mejor que el del surfactante.

20

25

[0060] El trioleato de residuo y el contenido de ácido palmítico en los extractos fueron calculados según las curvas estándares medidas por HPLC. Los picos de HPLC para TGs y trioleato no se mostraron en las muestras de tratamiento de lipasa (Figuras 2 y 3) mientras el trioleato de residuo en los extractos tratados por Eusapon fue tan alto como 15.2 mg/ml (Tabla 2). Estos resultados significaron que 100-200 KLU/kg de lipasa degradaron completamente todos los TGs en la piel de oveja bajo la condición de prueba, de este modo, el % de grasa medida en las muestras de lipasa tratada pueden ser mezclas de ácidos grasos o hidrosilatos de proteínas o jabón.

30

[0061] Además, se puede ver que en el gráfico HPLC, no hubo picos de ácido graso durante el tratamiento de la piel 200 KLU lipasa/kg, lo que significa que los ácidos grasos pueden haber sido transferidos en jabones por saponificación, pueden todavía haber quedado dentro de la piel o haber sido transferidos fuera de la piel. Durante el uso de piel de 100 KLU lipasa/kg, debido a que la velocidad para formar ácidos grasos fue más lenta que con el uso de lipasa de 200 KLU, la saponificación no fue completada, solo uno de los picos de ácido graso puede ser detectado, la posición de valor máximo es la misma que el ácido palmítico y el tiempo de retención del ácido oleico,

35

## ES 2 526 646 T3

debido a que el ácido oleico tiene puntos de fusión inferiores, este se transfirió en líquido y fue lavado más fácilmente que el ácido palmítico. Por lo tanto se sospechaba que la mayor parte del ácido graso detectado por este valor máximo fue ácido palmítico que fue 16.4 mg/ml (Tabla 2).

### 5 **Ejemplo 2.** Comparación de lipasas en la piel de oveja de nueva Zelanda conservada en salmuera

[0062] Las pieles de oveja son preparadas de la misma manera que el ejemplo 1. La prueba se realiza bajo la siguiente condición.

10 [0063] **Pasos de desengrasado:** la piel de oveja de Nueva Zelanda conservada en salmuera de material crudo se preparó como el ejemplo 1. Las condiciones de desengrasado fueron mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3

Proceso	Piel (g)	Tampón químico (ml)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desengrasado	40 g	50 ml	7	30	60
Drenaje					
Lavar las piezas de piel en agua corriente					2

El tampón químico contiene 8% del peso NaCl i 4% del peso NaHCO<sub>3</sub>.

15 [0064] El ejemplo se efectuó como cuatro grupos de prueba de funcionamiento. Se añadieron dos lipasas en el tampón químico según la Tabla 3 en el paso de desengrasado para cada uno de los ensayos de comparación. Blanco fue solo tampón químico. No tratada fue la piel conservada en salmuera original sin ningún tratamiento de desengrasado usado como una comparación.

20 Tabla 4

Grupo n°.	Tratamiento	Peso de la piel mojada (g)	Peso de piel seca	Grasa %
1	En blanco	40.47	15.898	17.9
2	Lipasa de referencia 200 KLU/kg piel mojada	40.62	17.157	17.4
3	Lipasa 200 KLU/kg de piel mojada	40.63	17.007	13.6
4	No tratado	40.39	18.303	18.8

[0065] La lipasa de referencia usada en el Grupo 2: lipasa primaria *Humicola lanuginose* como SEQ ID NO: 1 de la presente solicitud.

25 [0066] La lipasa usada en el Grupo 3: variante de lipasa con dos sustituciones T231 R+N233R en SEQ ID NO: 1.

[0067] A partir del resultado de la Tabla 4, se puede observar que cuando no hay surfactantes en el sistema, las lipasas actúan diferentemente en el desengrasado. El residuo de grasa de la lipasa de variante en el grupo 3 es 13.6%, el cual es muy inferior al de la lipasa de referencia que es casi el mismo que en blanco (17.4 vs. 17.9).

### 30 **Ejemplo 3:** surfactante y sinergias de lipasa bajo condición de encalado

[0068] Este ejemplo muestra el proceso de desengrasado así como se aplica a piel de oveja encalada (disponible en Shanghai Oujiayu Trading Co., Ltd. PRC). La lipasa utilizada en este ejemplo y el ejemplo 4 es una variante de lipasa de dos sustituciones T231R+N233R en SEQ ID NO: 1 (obtenido según WO 00/60063).

35 [0069] **Paso de desengrasado:** la piel de oveja encalada de material crudo se preparó como el ejemplo 1. Las condiciones de desengrasado se muestran en la Tabla 5. El tampón químico usado en este ejemplo es agua para imitar la condición de encalado.

Tabla 5

Proceso	Piel (g)	Tampón químico (ml)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desengrasado	50 g	100 ml	12	30	60
Drenaje					
Lavar la piel en agua corriente					2

[0070] El ejemplo se efectuó como ocho grupos de prueba de funcionamiento. La lipasa y/o el surfactante EUSAPON@ OD fueron añadidos en el tampón químico según la Tabla 6 por el peso de piel en el paso de desengrasado para cada uno de los ensayos de comparación. Blanco fue solo tampón químico.

45



Tabla 6

Grupo n.º	Tratamiento	Piel	Tampón químico	Lipasa*	Eusapon OD**
1	En blanco	50 g	100 ml	-	-
2	0.5% T1	50 g	99 ml	-	1 ml
3	1% T1	50 g	98 ml	-	2 ml
4	0.05% L	50 g	99 ml	1 ml	-
5	0.1% L	50 g	98 ml	2 ml	-
6	0.1%L+0.5%T1	50 g	97 ml	2 ml	1 ml
7	0.1%L+1%T1	50 g	96 ml	2 ml	2 ml
8	0.1%L+2%T1	50 g	94 ml	2 ml	4 ml

T1 representa EUSAPON® OD de surfactante, L representa Lipasa.  
 \* La concentración de lipasa es 25 mg/ml.  
 \*\* La concentración de Eusapon OD es 250 mg/ml.

[0071] La prueba de extracción de grasa fue conducida según el método en el ejemplo 1, excepto que en este ejemplo se usó hexano en vez de  $\text{CHCl}_3$ .

[0072] El análisis de HPLC fue usado para analizar la composición de grasa residual, pero solo los picos representativos fueron usados para cuantificar los triglicéridos o el contenido de ácido de grasa libre.

#### Resultados

[0073] Es evidente en la Figura 5 que en la piel no ha sido eliminada ninguna cantidad significativa de grasa por parte de T1 solo con la dosis de 0,5% y 1%, respectivamente. Una reducción de grasa dependiente de dosis y la liberación de FAs (FA en la figura 5 representa ácidos grasos) por parte de EUSAPON® OD se pueden obtener cuando se usa junto con un 0.1% lipasa, y la reducción se vuelve manifiesta cuando el 2% de EUSAPON® OD ha sido dosificada con solo una pequeña cantidad de FAs residual vista en el cromatógrafo de HPLC. Los resultados indican efectos obvios de desengrasado sinérgico entre la lipasa y el surfactante especialmente en dosificaciones más altas.

#### Ejemplo 4: surfactante y sinergias de lipasa bajo condición de descalcado

[0074] Pasos de desengrasado: la piel de oveja encalada de material crudo se preparó como en el ejemplo 1. Las condiciones de desengrasado se muestran en la Tabla 7. El tampón químico usado en este ejemplo es 1.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para imitar la condición de descalcificación.

Tabla 7

Proceso	Piel (g)	Tampón químico (ml)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desengrasado	50 g	100 ml	8	30	120
Drenaje					
Lavar la piel en agua corriente					2

[0075] El ejemplo se efectuó como ocho grupos de prueba de funcionamiento. La lipasa y/o el surfactante fueron añadidos en el tampón químico según la Tabla 8 por el peso de piel en el paso de desengrasado para cada uno de los ensayos de comparación. Blanco fue solo tampón químico.

[0076] Los surfactantes no iónicos fueron Lutensol® ON60 y Neodol® 25-7, mientras el surfactante aniónico fue la cadena corta LAS con una longitud de cadena de hidrocarburo media de 11, con 25% de LAS, 25% de Neodol® 25-7 y 50% de Lutensol® ON60.

Tabla 8

Grupo n.º	Tratamiento	Piel	1.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Lipasa*	T2**
1	Blank	50 g	100 ml	-	-
2	5%T2	50 g	99 ml	-	10 ml
3	10%T2	50 g	90 ml	-	20 ml
4	0.1%L	50 g	80 ml	1 ml	-
5	0.1%L+0.5%T2	50 g	98 ml	1 ml	1 ml
6	0.1%L+1%T2	50 g	97 ml	1 ml	2 ml
7	0.1%L+2%T2	50 g	95 ml	1 ml	4 ml
8	0.1%L+5%T2	50 g	89 ml	1 ml	10 ml

T2 representa el surfactante, una mezcla del 25% de LAS, 25% de Neodol® 25-7 y 50% de Lutensol® ON60; L representa la Lipasa.

\* La concentración de lipasa es 50 mg/ml.  
\*\* La concentración de T2 es 250 mg/ml.  
La prueba de extracción de grasa y el análisis de HPLC fueron conducidos como el ejemplo 3.

Resultados

5 [0077] La Figura 6 indica que hay un efecto sinérgico de T2 y lipasa en la hidrólisis de grasa, ya que T2 y lipasa juntas producen más FA y menos TG que cualquiera de ellos usados a solas. Cuanto más alta sea la oferta de T2, una mejor eliminación de FA se hace evidente. T2 puede tener una capacidad de eliminación de FA óptima. Como se muestra en la Fig. 6, el 0.1 % de lipasa combinado con 5% de T2 produjo un contenido de grasa inferior y un FA un poco más alto que el 10% de T2 a solas ilustrando un efecto de desengrasado sinérgico entre ellos.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0078]

- 15 <110> Novozymes A/S
- <120> Un tratamiento enzimático de desengrasado de piel y pellejo
- <130> 11216.000
- 20 <160> 1
- <170> Versión de PatentIn 3.4
- <210> 1
- 25 <211> 269
- <212> PRT
- <213> Humicola lanuginosa
- <220>
- 30 <221> mat\_peptide
- <222> (1)..(269)
- <400> 1

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr  
 20 25 30  
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp  
 35 40 45  
 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr  
 50 55 60  
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp  
 85 90 95  
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly  
 100 105 110  
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val  
 115 120 125  
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly  
 130 135 140  
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val  
 165 170 175  
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr

			180					185					190			
Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	
		195					200					205				
Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	
	210					215					220					
Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	
225					230					235					240	
Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro	Asn	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	
				245					250					255		
Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly	Thr	Cys	Leu				
			260					265								

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proceso para desengrasado enzimático de pieles o pellejos, este proceso comprende el tratamiento de la piel o pellejo con una variante de lipasa que ha sido derivada de una lipasa parental de aminoácidos 1- 269 de SEQ ID NO: 1 por la doble sustitución T231R y N233R, y donde tratamiento con lipasa tiene lugar durante uno o más de los pasos de remojo, pelado, desengrasado y solución de decapado.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1, donde el proceso se aplica a pieles ovinas, pieles porcinas, pieles bovinas, o pieles caprinas.
3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el tratamiento de lipasa tiene lugar en un medio acuoso opcionalmente en presencia de un surfactante.
- 15 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el proceso tiene lugar como un paso separado después del remojo, pelado, calcificación, desengrasado, baño de mordiente y solución de decapado.
- 20 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la lipasa se añade en una cantidad de 10 a 600 KLU por kg de piel.
6. Proceso según la reivindicación 5, donde la lipasa se añade en una cantidad de 50 a 400 KLU por kg de pellejo o piel.
- 25 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el proceso se realiza con un pH en la gama de 6 a 13.
8. Proceso según la reivindicación 7, donde el proceso se realiza con un pH en la gama de 7 a 11.
- 30 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el proceso se realiza a una temperatura en la gama de 15 a 65°C.
10. Proceso según la reivindicación 9, donde el proceso se realiza a una temperatura en la gama de 20 a 40°C.

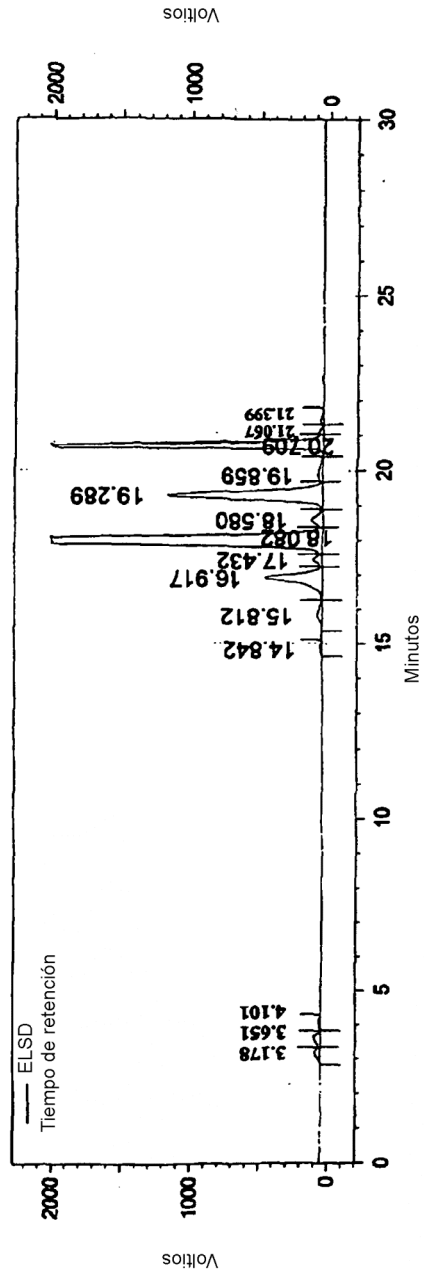


Figura 1

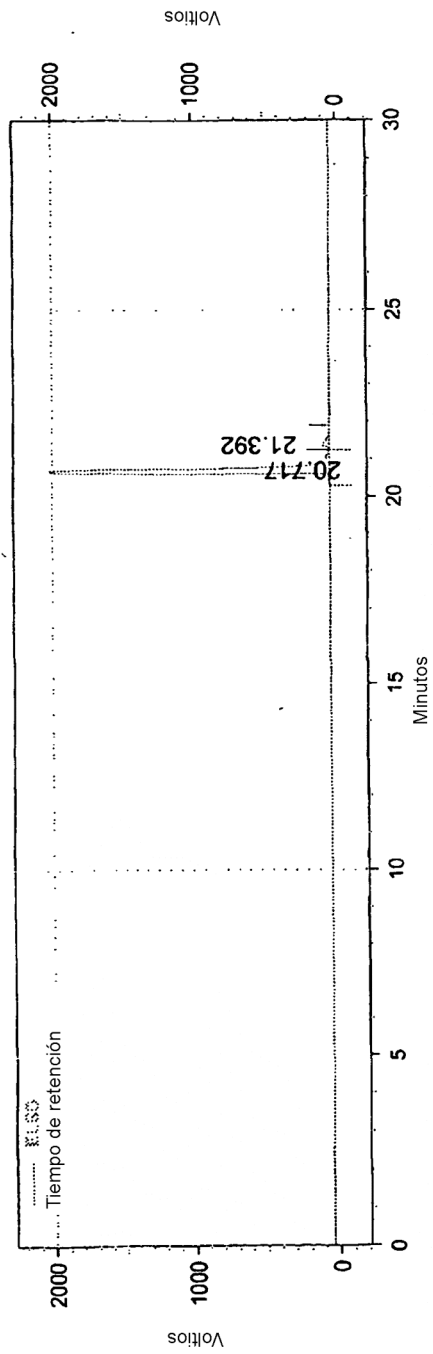


Figura 2

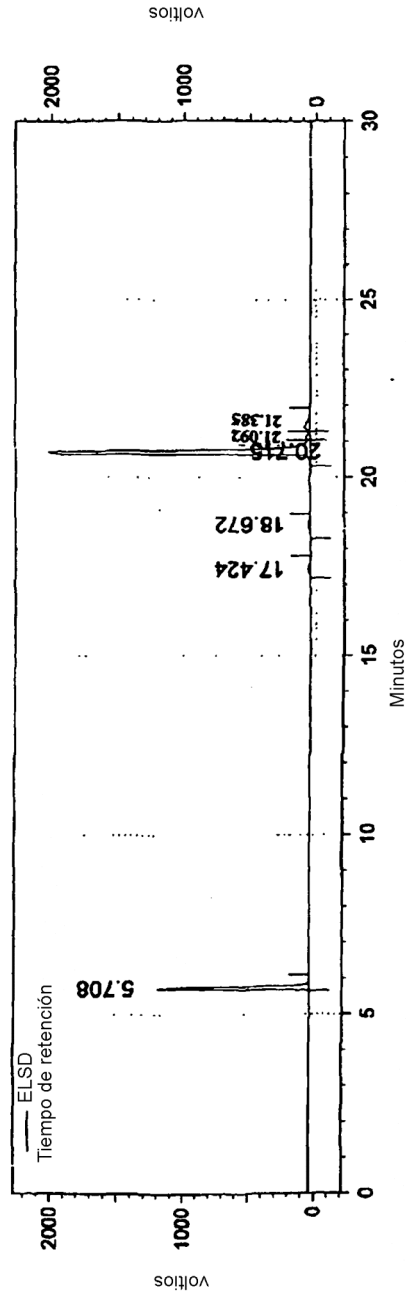


Figura 3



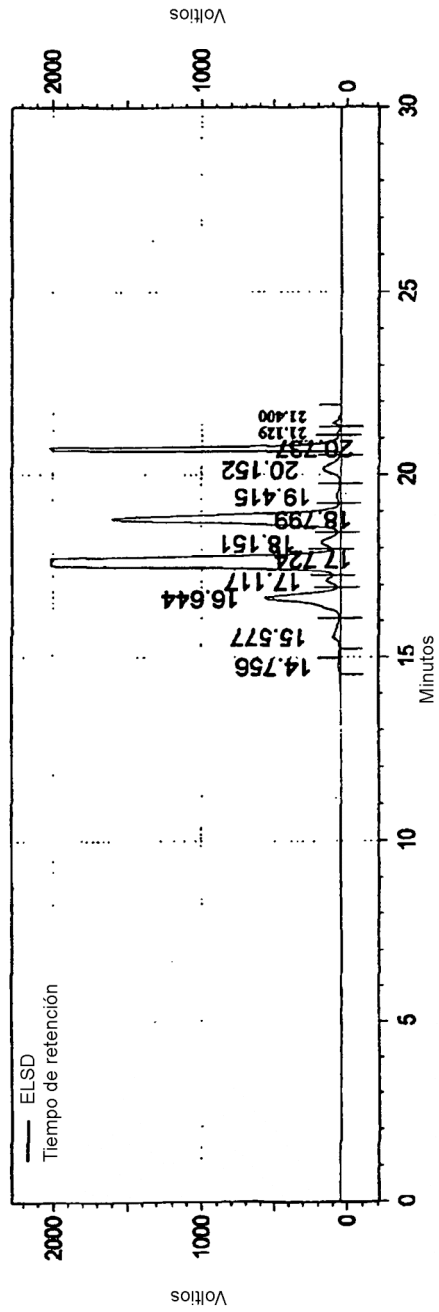


Figura 4

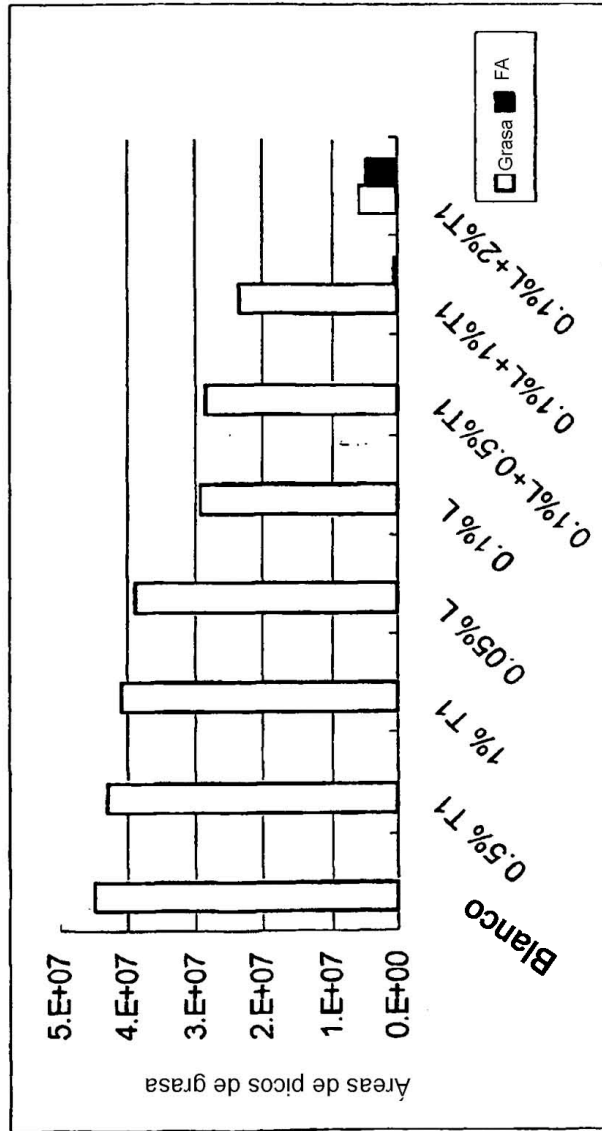


Figura 5

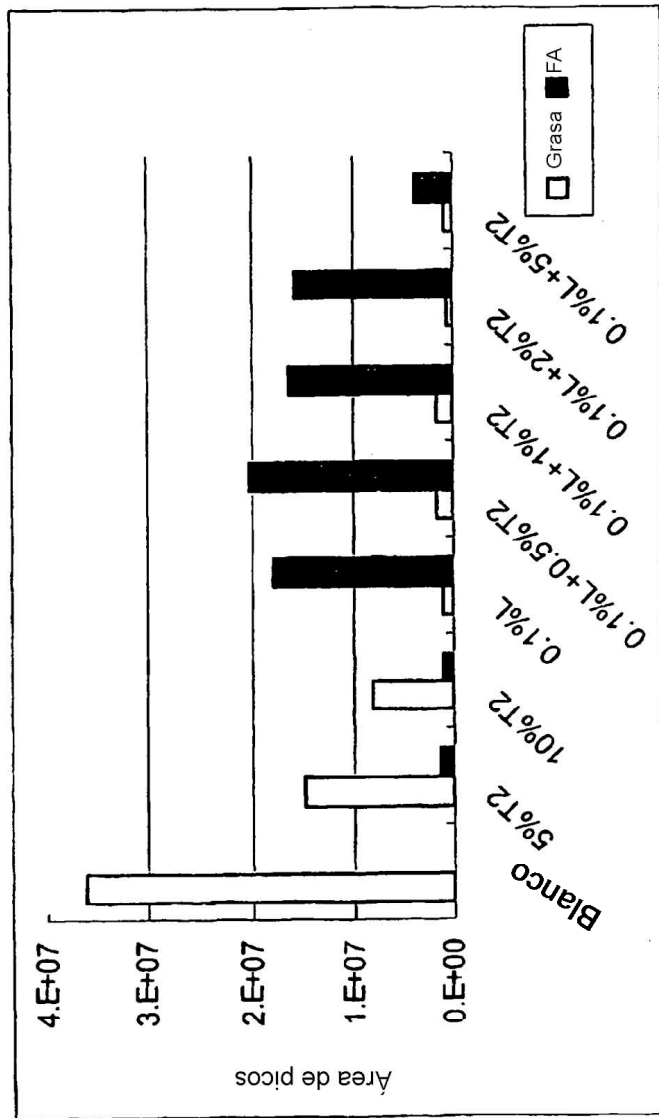


Figura 6