



MEMORIA DESCRIPTIVA
 para solicitar
 P A T E N T E D E I N V E N C I O N
 en
 E S P A Ñ A
 por VEINTE años
 por " Un procedimiento para produ-
 " cir productos diastásicos ".

A nombre de

INTERNATIONAL TAKAMINE FERMENT COMPANY

establecida en

120, Broadway, Nueva York,

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

*****:

Actualmente se hace general aplicación de un procedimiento de fabricación de un producto diastásico en el que los hongos productores de diastasa se cultivan en un aparato constituido por una especie de tambor de volteo. Nuestro invento se refiere en parte a un perfeccionamiento introducido en un proce-

dimiento de este género.

Hemos expuesto un procedimiento que, aplicado comercialmente, da una seguridad mucho mayor de producción que los practicados anteriormente, un producto de mayor contenido en diastasa. En nuestro procedimiento nos servimos del mismo aparato o de otro análogo al usado con el procedimiento antiguo, y nuestra mejora consiste en un procedimiento modificado de cultivar los esporos en el tambor y un procedimiento para producir gérmenes o esporos de mayor valor. Aunque pueden conseguirse resultados mejores utilizando una parte sola de nuestro invento, los mejores resultados se alcanzarán utilizando el germen perfeccionado obtenido de conformidad con nuestro invento a la vez que el procedimiento mejorado para producir de aquí un producto diastásico.



El procedimiento perfeccionado de cultivo del producto diastásico se describe a continuación. Se introduce suficiente medio de cultivo, que puede ser salvado de cereales, en un tambor, a una profundidad de 3 a 4 pies. Este medio de cultivo consiste preferentemente en salvado de trigo, un cuando pueden utilizarse otros. Si, por ejemplo, comenzamos con 3.600 libras de salvado, se rocían con una solución antiséptica, cuya composición preferida es la siguiente:

Salicilato de sodio	6,96 libras
Fluoruro sódico	7,56
Agua	630

El tambor se mueve a la velocidad de una revolución en 1-1/2 a 2-1/2 minutos, cuando comienza a rociarse la solución, y sigue moviéndose hasta conse-

guir una mezcla completa. Entonces se admite vapor en el tambor, que sigue girando, con el fin de esterilizar el medio y destruir los bacilos que pueden ser perniciosos o dañinos para la producción de los hongos. Esta fase de esterilización por vapor puede durar una hora y media, o menos si el tambor es impenetrable al vapor y se usa vapor de alta presión. Antes de conocerse nuestro invento, se consideraba que el mínimo de tiempo para realizar la esterilización era de cuatro horas, valiéndose de los procedimientos antiguos.

Una vez terminada la esterilización, se hace pasar una corriente de aire, a ser posible enfriado, por el tambor, en contacto con el medio de cultivo con el fin de reducir la temperatura de éste al grado más apropiado para el subsiguiente tratamiento de los hongos. El aire utilizado para la refrigeración puede muy bien enfriarse y limpiarse, y humedecerse hasta saturación. Cuando la masa se enfría hasta 55°C aproximadamente, se rocía con una solución de la composición aproximada siguiente, mientras el tambor sigue moviéndose:

Acido clorhídrico al 30%	27,2 libras
Agua	335

En lugar del ácido clorhídrico pueden emplearse cantidades equivalentes de otros ácidos inorgánicos, como el nítrico o el fosfórico. Una vez enfriada la masa a una temperatura de 45°C, poco más o menos, comienza la introducción de los esporos fúngicos. Esto conviene hacerlo rociando la masa con una suspensión de los esporos en agua. Como antes se ha dicho, preferimos emplear los esporos perfeccionados producidos de conformidad con nuestro invento en la forma que lue-



Se se describirá, y tomamos estos esporos preferentemente en la siguiente proporción:

Esporos correspondientes a 600 gramos
de medio de cultivo.

Agua 250 libras.

Terminada la mezcla, la masa se habrá enfriado a una temperatura de 36 a 40°C. A esta temperatura, la masa se deja reposar durante unas 12 horas.

Luego se pone en movimiento el tambor, a una velocidad aproximada de 1 revolución por cada 1-1/2 a 2-1/2 minutos. Luego puede hacerse pasar aire húmedo caliente, a unos 30-40°C., a través del tambor, con el fin de expulsar el bióxido de carbono que se produce a medida que avanza el crecimiento de excrecencias. Como la temperatura aumenta gradualmente, el aire puede enfriarse y aumentarse su volumen, con el fin de mantener la temperatura de la masa por debajo de 42°C. En el caso de que la temperatura atmosférica sea elevada y la masa esté expuesta a recalentarse, puede pasarse una corriente de agua fría por el casco del tambor. La señal de crecimiento se aprecia al cabo de 18 horas, y dicho crecimiento termina en 42 a 48 horas aproximadamente, contadas desde que se introducen los esporos. El producto así obtenido se denomina koji.

Las cantidades de antisépticos dadas corresponden a 1,7 partes de ácido salicílico y una parte de ácido fluorhídrico para cada 1000 partes de medio de cultivo seco. Pero pueden obtenerse resultados satisfactorios cuando se aumenta la cantidad de antisépticos o se reduce en un 50 % de estos valores.



2

Además de emplear un germen de cultivo diferente, el procedimiento arriba descrito se considera distinto de los antiguos, entre otros, por los siguientes particulares:

1 - El antiséptico se introduce antes del tratamiento por vapor, de manera que cierta cantidad de acción antiséptica se consigue a la temperatura de aquél tratamiento. Además, se introduce ácido salicílico en forma de su sal sódica, que es sumamente soluble en agua, y a la elevada temperatura aplicada, lo mismo este producto que el fluoruro sódico pueden penetrar bien en los poros del salvado u otro medio de cultivo.



80

2

2 - Una vez que los antisépticos han penetrado bien del modo explicado en la masa del salvado y con preferencia antes de introducir los gérmenes o esporos, se descomponen aquéllos en sus correspondientes ácidos, cuya acción antiséptica es mucho mayor que la de las sales. Se observará que el ácido salicílico es relativamente insoluble en agua. Además los ácidos salicílico y fluorhídrico son hasta cierto punto volátiles en vapor, y si estuvieran presentes como tales durante el tratamiento con vapor, resultaría de ello una pérdida considerable de estas substancias. En el caso de que los antisépticos mencionados estén presentes en forma de ácidos, se supone que sus efectos serían nulos por las siguientes causas: En el salvado existe en cantidad considerable proteína, que, como es sabido, contiene, aparte otras clases de combinaciones, nitrógeno y otras bases en diversos estados de combinación, y como fruto de largos experimentos se ha comprobado que a las temperaturas de esterilización es muy probable que se combinarán estas bases y los antisépticos en forma de ácidos libres, destruyendo la acti-

vidad de los últimos como bactericidas.

3 - La masa se halla en un estado altamente antiséptico, y en él se mantiene cuando se introduce aire frío, lo cual impide la continuación por parte de estefoco.

4 - Los antisépticos se introducen en mayor proporción con respecto a la cantidad total de agua agregada, con lo que pueden penetrar más íntimamente en las partículas de salvado.

Hemos visto que se obtienen resultados superiores cuando se utilizan esporos germinativos preparados con arreglo al siguiente procedimiento, que forma parte de nuestro invento. Tomamos, por ejemplo 200 gramos de cereales en salvado, por ejemplo, salvado de trigo, y con ellos mezclamos íntimamente 50 C.C. de una solución en la cual se hayan disuelto de 2,32 a 4,64 gramos de salicilato sódico (equivalente a 2-4 gramos de ácido salicílico). La masa humedecida se echa en una vasija apropiada, por ejemplo, una botella de boca ancha de capacidad aproximada de un galón, cuya abertura se tapa con una capa de dos a tres hojas de papel de filtro grueso, encima de la cual se coloca un trozo de franela gruesa;. Las hojas de la etapa se atan en torno al cuello con una cuerda, y la botella se esteriliza en un autoclave, por vapor a una presión de 15 libras, durante una hora aproximadamente. Luego se saca y se enfría. A continuación se introducen cuidadosamente en la botella 50 c. c. de ácido clorhídrico en agua esterilizada que contenga alrededor de 14,5 c. c. del ácido normal, evitando cualquiera posible penetración de polvo cargado de gérmenes. Luego se agita vigorosamente la botella, con el fin de dis-



2

tribuir bien el líquido introducido por toda la masa. El ácido clorhídrico así añadido desprenderá ácido salicílico del salicilato sódico. Los esporos de aspergillus orizae se introducen y mezclan bien con el contenido de la botella, rociándose el medio sobre los lados del mismo. Luego se deja durante una semana o más a una temperatura comprendida entre los 30 y los 33°C. Las excrecencias crecen y se propagan por toda la masa, fructificando los esporos dentro de ese tiempo. Luego se cubre bien la masa de esporos fúngicos y presenta un aspecto amarillo-verdoso, estando los esporos en disposición de usarse.

Si se quiere conservar los gérmenes o esporos durante algún tiempo, todo el contenido de la botella puede echarse en una bolsa de papel, asepticada por medios conocidos y secada en una corriente de aire a una temperatura no mayor de 50°C. En estado seco, los esporos pueden conservarse durante dos a tres años sin pérdida apreciable de vitalidad.

Cuando los esporos así obtenidos han de usarse inmediatamente, la masa producida según queda explicado se suspende en agua esterilizada, y los esporos se separan del medio de cultivo con ayuda de un colador apropiado, esterilizado también previamente. La suspensión de esporos está entonces en condiciones de introducirse en el caldo de cultivo, rociándola o de otro modo que convenga.

El ácido salicílico puede añadirse al medio de cultivo de la botella directamente en agua caliente, prescindiéndose del uso a continuación de ácido clorhídrico, pero en este caso puede perderse parte del antiséptico por volatilización, sin lograr una penetra-



ción completa del antiséptico en la substancia del salvado. Puede usarse ácido benzoico en vez de salicílico, pero con resultados menos satisfactorios, pues el ácido benzoico tiene un efecto tóxico mucho mayor sobre las excrecencias o hongos.

Creemos que nuestro procedimiento de cultivo de esporos se distingue de los antiguos en emplearse una cantidad mucho mayor de antisépticos que la considerada en ellos como máxima prácticamente. Además, el antiséptico se introduce en el medio de cultivo antes de la esterilización por vapor, y en una forma mucho más soluble. En esta forma puede penetrar por completo en la substancia del salvado, exponiéndose éste a su acción aumentada, a la temperatura de esterilización.



8

2

Utilizando el germen perfeccionado en el procedimiento descrito antes, se obtiene un producto final superior a cualquiera otro conseguido hasta ahora comercialmente. Según se ha probado por el método Lintner, la fuerza diastásica de nuestro producto final es de 6.000 a 12.000 por ciento, lo que viene a ser un 100% más fuerte que la de cualquiera otro producto comercial obtenido antes. Actualmente se considera que se obtienen condiciones ideales cuando la producción de substancia diastásica supone de 0,15 a 3,0% en peso del material empleado. El éxito del procedimiento, sin embargo, no se mide por la producción solamente, sino también por la fuerza diastásica del producto. En los procedimientos seguidos hasta ahora, la producción estaba en razón inversa de la fuerza diastásica, pero con nuestro procedimiento obtenemos un producto cuya fuerza diastásica viene a representar el

doble de la de los productos obtenidos por procedimientos antiguos, y al mismo tiempo esta producción se mantiene dentro de los límites antes fijados. Por otra parte, en los procedimientos antiguos era mas frecuente el fracaso que el éxito, de modo que no podía confiarse en el resultado de la operación. Nuestro procedimiento, por el contrario, proporciona buen resultado en todo caso, y puede, por tanto, tenerse confianza en él. Y no sólo da buen resultado siempre, sino que proporciona un producto mas fuerte que el anteriormente conseguido en las condiciones consideradas mas favorables.

Obtenido el koji del modo antes descrito el material enzimoideo soluble puede extraerse del modo conocido, para llegar al producto final.

Si bien se ha descrito nuestro invento por menor, indicándose cantidades exactas, se ha de entender que tal descripción es sólo ilustrativa, y que en su desarrollo y en las cantidades puede variar sin apartarse por ello del espíritu de nuestro invento.

- o - N O T A - o -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta patente de VEINTE años, son los siguientes:

1º. - El procedimiento de fabricación de producto diastásico, que consiste en impregnar un medio de cultivo apropiado para la fructificación de



fungos o excrecencias, con una sal soluble en agua o un radical ácido antiséptico, esterilizar el medio, liberar el radical antiséptico por adición de un ácido mineral diluido, inocular el medio con esporos de aspergillus orizae, y someter el mismo a condiciones de incubación.

2º. - El procedimiento de fabricación de producto diastásico conforme se reivindica en el punto 1º., caracterizado por el uso de una solución acuosa de salicilato sódico y fluoruro sódico, con el que se impregna el medio de cultivo, en lo esencial como queda explicado.

3º. - El procedimiento de fabricación de producto diastásico conforme se reivindica en los puntos 1º. y 2º., caracterizado por efectuarse en un tambor o vasija cerrado, empleando vapor como agente de esterilización para el medio de cultivo, en lo esencial como queda explicado.

4º. - Un procedimiento para producir productos diastásicos.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diez hojas escritas por una sola cara.

Madrid 28 de Mayo de 1927.

P. A.

Alberto de Elzaburu
Por Peder

