

P - 13.194

M/1a/3

- 6 MAY. 1955

221611

221611



MAY. 1955

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

a nombre de C.H. BOEHRINGER SOHN, entidad alemana, establecida en Ingelheim/Rhein, Alemania, por:

"MEJORAS INTRODUCIDAS EN LA OBTENCION DE PREPARADOS ENZIMATICOS LIQUIDOS".

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

El presente invento se refiere a preparados enzimáticos líquidos, que sirven para la clarificación de zumos de frutas, vinos y similares.

La obtención de preparados enzimáticos sólidos con gran actividad enzimática para la clarificación de

5



221611

5 zumos de frutas y vinos, es ya conocida desde hace mucho tiempo. Su aplicación consiste en que los preparados son pesados antes de su uso, teniendo que ser puestos en solución mediante digestión en una pequeña proporción de zumo de vino, para entonces desplegar su actividad en el mosto ó el vino, en estado disuelto.

10 Tal proceder es muy complicado, por lo cual existe una demanda de preparados enzimáticos líquidos, que puedan ser medidos antes de su empleo con una medida de líquidos e inmediatamente incorporados al mosto o vino a tratar.

15 Ahora bien, la obtención de tales soluciones enzimáticas tropieza normalmente con grandes dificultades, ya que estas soluciones son inestables, no pudiendo, por lo tanto, ser conservadas. En el transcurso de pocos días desciende con gran rapidez la actividad enzimática de tales preparados, tendiendo además estas soluciones a infecciones. Ensayos para la obtención de tales preparados han sido ya acometidos frecuentemente. Generalmente  
20 se provocaba una estabilización de las soluciones mediante la adición de elevadas concentraciones de sales. Así, por ejemplo, se estabilizó de acuerdo con la separata de Chem. Abstracts, 46, pág. 10 556 (1952) una solución de  $\alpha$ -amilasa para el desapestado de tejidos, mediante la adición de  
25 fosfato sódico, cloruro cálcico, cloruro sódico y fenol. Estas adiciones, como es natural, no pueden hallar aplicación en la obtención de preparados enzimáticos destinados



221611

a la industria alimenticia.

Isbell y Frush (J. Research Natl. Standards  
33, pág. 389, citados en "The Pectic Substances" de Kertesz,  
pág. 380) si bien han descrito, que los micelios cultiva-  
5 dos para la formación de ácido cítrico o de penicilina,  
poseen una considerable actividad degradante de la pectina,  
no mencionan en cambio nada sobre la actividad de la propia  
solución de fermentación, ni sobre su estabilidad.

Se ha descubierto ahora, que después de ter-  
10 minada una fermentación ácida llevada a cabo con microorga-  
nismos formadores de ácidos o cultivados para la formación  
de ácidos, la solución nutritiva en sí es mucho más fuerte-  
mente activa pectolíticamente, que el micelio recogido, y  
además, que esta acción enzimática se conserva sorprenden-  
15 temente durante tiempo bastante ilimitado, sin adiciones  
de agentes conservadores o de sales estabilizadoras.

En la realización del procedimiento de acuer-  
do con el invento, puede ser recomendable, desembarazar to-  
tal o parcialmente la solución de fermentación ácida, de  
20 los ácidos en ella contenidos.

En otro perfeccionamiento del procedimiento  
según el invento, se puede aumentar todavía la actividad  
enzimática de la solución de fermentación ácida, extrayendo  
de esta solución de fermentación los microorganismos apro-  
piados para la formación de ácidos.  
25

Bajo microorganismos formadores de ácidos  
deben entenderse microorganismos capaces de realizar fer-



26 M  
221611

mentaciones oxidantes. A este grupo pertenecen los mohos, que pueden producir ácidos orgánicos. Como representantes calificados citaremos: el *aspergillus niger*, el *penicillium glaucum*, variedades del *aspergillus flavus*, etc. (Bibliografía: Nord-Weidenhagen, Handbuch de Enzymologie, II, pág. 1080-1113). Los microorganismos cultivados para la formación de ácidos, provienen de una selección realizada por los métodos conocidos antes de preparar la solución enzimática.

10 En el procedimiento de acuerdo con el invento, que consiste en el aprovechamiento de la formación de ácidos y en la acción enzimática de las soluciones de fermentación obtenidas, o alternativamente de su acción estabilizadora sobre las enzimas, resulta ventajoso, llevar a  
15 cabo la selección y el cultivo de los microorganismos de tal modo, que tenga lugar una fuerte formación de ácido en la solución de fermentación.

Para el cultivo y la formación de ácido son aplicables las reglas que son familiares a todo perito en la materia: Con los esporos de una cepa de hongos aislada de la manera conocida mediante selección, por  
20 ejemplo de una variedad de *aspergillus niger*, se inocula una solución de melaza previamente esterilizada, que mediante dilución en agua, se ajusta a un contenido de azúcar de 12 - 14 %, y que, dado el caso, se libera de posibles perjudiciales iones de hierro y cinc, con ayuda de  
25 ferrocianuro potásico. La fermentación ácida dura, a alre-



221611

5      dedor de 35°, unos 8 a 12 días. Al cabo de este tiempo queda concluida la formación de ácido, y la acumulación de enzimas en la solución de fermentación. El ácido orgánico puede ser entonces precipitado en condiciones moderadas, mientras que la solución de fermentación restante puede ser empleada, o bien directamente como solución enzimática, o bien después de la extracción de otros micelios en dicha solución de fermentación, en calidad de solución enzimática de acción enzimática aumentada.

10           La actividad estabilizadora de estas soluciones enzimáticas se conserva aún en el caso de que los micelios cultivados sobre un suelo nutritivo sólido, se extraigan además en las soluciones enzimáticas correspondientes, para aumentar adicionalmente la acción enzimática.

15           A base de los ejemplos siguientes ilustraremos a continuación el procedimiento de acuerdo con el invento:

Ejemplo 1:

20           En una melaza esterilizada, ajustada por dilución en agua a un contenido de azúcar de 12 - 14 % y purificada casi por completo de molestos iones de hierro ó de cinc con ayuda de  $K_4 [Fe(CN)_6]$ , se hacen crecer microorganismos formadores de ácidos. Una vez transformado el azúcar dentro de la solución de fermentación en  
25      ácido, se recoge la capa de hongos, pudiendo emplearse la solución de fermentación ácida como solución enzimá-



26 MAY

221611

tica.

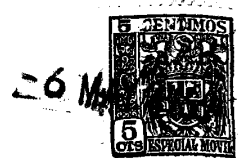
Ejemplo 2:

El cultivo se realiza tal como ha sido descrito en el Ejemplo 1. Después de la recolección se agregan carbonatos o hidróxidos alcalino-térreos hasta que el valor pH de la solución de fermentación se halla entre 5,5 - 6,5. A continuación se calienta brevemente la solución enzimática a 50 - 60°, mientras se agita, extrayéndose por prensado las sales cálcicas precipitadas del ácido, en filtro - prensa. La solución desacidificada ha conservado toda su acción enzimática y estabilidad.

Ejemplo 3:

El cultivo de los micelios y la desacidificación de la solución de fermentación se realizan tal como se ha mencionado en los Ejemplos 1 y 2. A continuación se incorporan a la solución enzimática, 15% en peso de un cultivo de moho, que han sido cultivados de la manera conocida. Esta mezcla se mantiene durante aproximadamente 3 horas a 35°.

El cultivo de los micelios destinados a la extracción sobre suelos nutritivos sólidos, se efectúa de manera, que por ejemplo se mezclan 80 partes de salvado de trigo y 20 partes de recortes de remolacha, con 100 partes de agua, se ajusta un valor pH de 5,4 con ayuda de ácido láctico, y una vez esterilizado este suelo nutritivo a 100°, se inocular la mezcla enfriada a 30° con esporos de moho. Al cabo de 3 - 4 días, el suelo nutritivo está



221611

lleno de micelios, que pueden ser recogidos. Según la familia de enzimas característica que se desee, pueden sustituirse los recortes de remolacha, que se emplearon aquí para la estimulación de la actividad pectinásica de los micelios cultivados, por ejemplo por harina de cuscú-  
 5 no, para así obtener micelios de actividad más proteolítica. Debido al tratamiento de los cultivos de moho con la solución enzimática, las enzimas contenidas en los micelios pasan a la solución enzimática desacidificada.

10 Después de una segunda filtración de los residuos de micelios, se obtiene ahora una solución enzimática reforzada y estable, debido al cultivo agregado.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Alemania el 10 de Mayo de 1954, bajo el No. B.  
 15 30.974 IVA/6d, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de In-  
 20 vención en España, por VEINTE años, son los siguientes:



221611

1ª. - Mejoras introducidas en la obtención de preparados enzimáticos líquidos destinados a la clarificación de zumos de frutas, vinos y similares, caracterizadas por el empleo de la solución de fermentación ácida de microorganismos cultivados para la formación de ácidos, tal como por ejemplo el aspergillus niger.

2ª. - Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizadas por el empleo de la solución de fermentación ácida de microorganismos cultivados para la formación de ácidos, la cual es purificada total o parcialmente de los ácidos orgánicos en ella contenidos.

3ª. - Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizadas por el empleo de la solución de fermentación ácida de microorganismos cultivados para la formación de ácidos, en la que se extraen microorganismos, que son apropiados para la formación de ácidos.

4ª. - Mejoras introducidas en la obtención de preparados enzimáticos líquidos.

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

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

Madrid, -6 MAY. 1955

P. A.

Alberto de Elzabur  
Por Poder

DG/.