



282 906

282 906

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INTRODUCCION

por DIEZ años en España, por "PROCESO PARA HI-

DROLIZAR PROTEINAS"

a favor de

VICTOR H. BERTULLO Y FERNANDO PEREZ HETTICH

domiciliado en MONTEVIDEO (URUGUAY)



282906

La presente invención se relaciona con un proceso de hidrolisis de materiales proteínicos y con el resultante producto. Más particularmente, la invención se refiere a un proceso de hidrolisis de proteínas por mezcla de material proteínico con el fermento *Saccharomyces platensis proteolytica*, n. sp., y fermentación de la mezcla hasta que las proteínas sean hidrolizadas.

Se ha descubierto que cuando se mezclan materiales proteínicos o se inoculan con un cultivo de *Saccharomyces platensis proteolytica*, la proteína es hidrolizada en polipéptidos y ácidos aminos, tras lo cual termina la acción proteolítica del fermento. Esto produce una pasta que contiene polipéptidos y ácidos aminos, manteniendo dicha pasta sus características físicas en almacenamiento durante un tiempo considerable sin requerir ningún agregado o rellenedor. Esta pasta puede usarse como forraje para alimentación de animales o como fertilizante. El forraje o producto hidrolizado tiene otros usos que se describirán más adelante.

Como fuente de proteína puede usarse cualquier material proteínico tal como pescado en su totalidad o partes del mismo, órganos internos de animales, embriones animales, productos de animales como huevos o carne, sangre, etc.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso de hidrolización de material proteínico.

Otro objeto es la provisión de un proceso para hidrolizar material proteínico por fermentación de una mezcla del material proteínico y el fermento *Saccharomyces platensis proteolytica*.

Otro objeto es el de proporcionar un producto que comprenda material proteínico hidrolizado.

Estos y otros objetos de la presente invención resultarán fácilmente evidentes mediante la siguiente descripción.

Se ha descubierto y aislado un nuevo fermento proteolítico que

282906



5 ha recibido el nombre de *Saccharomyces platensis proteolytica*. Este fermento fué aislado de la superficie del hígado de la "Corvina ronca dora" (*Micropogon opercularis*), un pez doméstico común en el Rio de la Plata. Este fermento fué aislado por métodos ordinarios de aislamiento de fermentos.

Se ha realizado un depósito de un cultivo de este fermento en la Escuela de Veterinaria de Montevideo, Universidad de la República de Uruguay, y se le ha asignado el número L. 1.040.

Propiedades morfológicas del *Saccharomyces platensis proteolytica*.

10 (1) Características de reproducción vegetativa.

a) En agar de patata a 25°C: Buen desarrollo y eficaz reproducción al cabo de 48 horas. Típico conglomerado de fermento de un tamaño variable. Después de 72 horas, vacuolas centrales o polares, predominando la forma esférica. Germinación por gemación que nace en cualquier parte de la célula, pero preferiblemente en los polos.

b) En agar de harina de maíz a 25°C: Gemación similar.

c) En caldo de dextrosa y sacarosa (caldo nutritivo Difco 0,8 %, sacarosa y dextrosa 1 %, agua destilada 100 ml): Brotes polares, en su mayoría en forma de un botón, que están unidos a la célula por un pedúnculo teñido en gramnegativo.

20 (2) Forma y tamaño de las células.

En medios de extracto de malta, agar de patata y harina de maíz a 25°C: Tamaño medio, 9 x 6 micras, siendo la célula más pequeña de 5 x 3 micras y la mayor de 15 x 8 micras.

25 (3) Formación de ascosporas.

30 Agar Gorodkova, bloques de yeso y trozos de patata o zanahoria fueron los materiales usados. Los trozos de patata y zanahoria fueron rechazados debido a un desarrollo demasiado vigoroso, con escasa producción de esporas al cabo de 8 días. Se usó la técnica de teñido de Kufferath. Número de ascosporas por célula: 2-3, muy frecuente; 1, muy



282906

frecuente; 4, muy raro. Emplazamiento: cuando hay sólo una, es polar o central; cuando dos, simétricas y polares; cuando tres, en un triángulo; y cuando cuatro, en un rombo.

(4) Propiedades de las ascosporas

Forma: "In vivo", muy esférica y teñidas, algo alargada o redonda.

Color: "In vivo", esferas refringentes y límpidas o con gránulos grisáceos en su interior. Con Kufferath, se tiñen en un rojo brillante.

División: No.

Arrugamiento de paredes: No. Arrugamiento de bordes: No.

Presencia de gotas de grasa: No.

Tamaño: "In vivo", 4 x 4 micras. Mediante Kufferath, 3 x 3 micras.

(5) Características macro-morfológicas de los cultivos

Extracto de malta, 25°C: Depósito formando abundante sedimento en el fondo del tubo y líquido sobrenadante límpido y translúcido.

En medio de Raulin, 25°C: Buen desarrollo, formando un depósito blanco grisáceo que asciende en forma de nube al agitar el tubo.

En un medio de caldo nutritivo de sacarosa y lactosa a 25°C: Abundante sedimento, color blanco grisáceo al cabo de 24 horas, aumentando hasta el cuarto o quinto día, estacionándose entonces la reproducción.

Se producen colonias en agar de malta, agar de malta más un 2 % de carbonato cálcico y en malta de gelatina, produciendo ésta última colonias gigantes.

Colonias: 8 días, lisas, levantadas, blancas vigorosas; 30 días, lisas, blancas, cremosas, lisas, mates y secas, borde festoneado.

Propiedades fisiológicas

(1) Formación de la película en un medio líquido.



282906

No forma una película en extracto de malta a 25°C y 17°C.

(2) Fermentación de azúcares.

5 Ensayos realizados en tubos de Durham y por el Método de Guerra a 25°C. Observaciones después de 24-48 horas y diez días. Fermenta la glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa. No fermenta a la lactosa. En un fermentómetro de Einhorn, fermenta dos tercios de rafinosa en 48 horas.

(3) Asimilación de azúcares

10 En un medio líquido a 25°C y un medio auxanográfico a 25°C: En el primero, al cabo de 30 días asimila a la glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa. No asimila a la lactosa. En el segundo, al cabo de tres días, lo mismo.

(4) Asimilación de nitratos

Medio líquido: sulfato amónico, positiva.

15 Por auxanografía:

a) Nitrógeno mineral, nitrato potásico y sulfato amónico: positiva.

b) Peptonas: Bacto triptone Difco y Peptone Meat Powder, de la Fine Chemical Company de Canadá: positiva.

20 c) Urea: positiva.

d) Ácidos aminos (acrílicos), Asparagina y glicocol: positiva.

e) Ácidos aminos (cíclicos), Histidina y triptofán: positiva.

(5) Etanol como única fuente de carbono

Negativa después de treinta días a 25°C.

25 (6) Partición de arbutina y esculina

Positiva después de 24 horas. Muy positiva después de 48 horas.

Cultivo a 25°C.

(7) Producción de pigmentos carotenoides

Por observación visual, negativa.

30 (8) Producción de compuestos similares al almidón



26

282 906

Negativa.

(9) Producción de ésteres

Negativa.

(10) Reacción en leche de litmus

Empieza después de 24 horas y se completa al cabo de cuatro días, peptonizando el medio, que se coagula pasados diez días.

(11) División de las grasas

Negativa.

(12) Producción de ácido

18 días, positiva.

(13) Proteolisis

a) Medio alcalino de huevos: Huevo (Manual of Microbiological Methods, pp. 55-56, de la Society of American Bacteriologists. McGraw-Hill Book Co.) con un 1 % de sacarosa: Un cuarto después de 24 horas; completa al cabo de 48 horas.

b) Hidrolisis de gelatina: 12 % de gelatina con 1 % de sacarosa; la hidrolisis empieza después de 48 horas y se completa al cabo de 10 días.

(14) Variación del pH en el medio de caldo de sacarosa nutritivo

pH inicial: 6,78; pH al cabo de 24 horas: 5,00; pH después de 48 horas: 4,25; pH después de 72 horas: 4,20; pH después de 4 días: 4,30; pH después de 7 días: 4,50; pH después de 18 días: 5,18.

(15) Poder alcohológeno

Fermentación de un líquido conteniendo un 0,8 % de caldo Difco nutritivo, 10 % de sacarosa y 100 ml de agua destilada a 25°C.

Azúcar restante (evaluada como azúcar invertida): 24 horas, 7,68 g; 48 horas, 4,76 g; 72 horas, 2,70 g; 7 días, 0,125 g.

Alcohol formado: 24 horas, 0,993 g; 48 horas, 2,840 g; 72 horas, 3,726 g; 7 días, 4,968 g.

Ejemplo.- El fermento o levadura anteriormente descrita está ad



282906

mirablemente adecuada para la hidrolización de material proteínico. A título de ejemplo, pueden usarse como materiales proteínicos pescado entero, restos de éste, órganos animales internos o embriones animales. Estos materiales se muelen finamente para hacer una pasta homogénea. También puede usarse sangre sin desfibrinar o huevos enteros como material proteínico.

Con 1.000 kg de cualquiera de los materiales anteriormente descritos o mezclas de ellos, se mezclan íntimamente 200 kg de azúcar y melazas de remolacha. A 100 kg de esta mezcla se agrega 1 litro de un cultivo del fermento o levadura *Saccharomyces platensis proteolytica*. Este cultivo tiene una concentración de un millón de células de levadura por ml. Sin embarlo, la concentración de las células de levadura en el cultivo es variable y puede incrementarse sin límite, si se desea.

La mezcla del material proteínico, azúcar y levadura se mantiene a una temperatura de 22 a 25°C. En ocasiones se agita la mezcla, por ejemplo tres veces al día, durante 8 días. Entre el tercer y el cuarto día, el volumen de la mezcla aumentará a más del doble y casi el triple del volumen original. Durante este período, el pH inicial, que es variable de acuerdo con el material proteínico inicial, disminuirá lentamente. Entre el cuarto y el quinto día, el pH será aproximadamente de 5,00-4,80 y empezará luego a ascender, estabilizándose entre el octavo y el décimo día entre 5,75 y 5,85 aproximadamente, en cuyo punto termina la fermentación.

El producto al final de la fermentación es una pasta que tiene pardo más o menos oscuro, dependiendo el color del material proteínico inicial. El olor de la masa en fermentación durante las primeras fases es el de fruta madura (manzana), asemejándose el olor final al de higos secos.

El producto final de la fermentación, si se mantiene frío y cu-



282906

bierto, conservará sus propiedades en almacenamiento durante un período indefinido.

5 Aunque la fermentación anteriormente descrita se efectúa preferiblemente a una temperatura de 22 a 25°C, la temperatura puede ser cualquiera a la que se desarrolle la levadura. En sentido lato, el orden de temperatura de fermentación está comprendido entre 8 y 37°C aproximadamente. Sin embargo, en la práctica, las temperaturas inferiores pueden no ser tan deseables porque la hidrólisis de la proteína es menos completa. La temperatura ideal para almacenar el producto final es de 12 a 18°C aproximadamente, si bien puede ser tan elevada como de 25°C e incluso algo mayor.

10 Durante la fermentación, la presencia o ausencia de oxígeno carece de importancia, ya que el fermento es anaeróbico. En el anterior ejemplo, la fermentación se llevó a cabo abierta a la atmósfera. Análogamente, la presencia o ausencia de oxígeno durante el almacenamiento carece de importancia.

15 En lugar de añadir azúcar o melaza de remolacha, puede hallarse presente cualquier azúcar fermentable durante la fermentación. Por ejemplo, puede usarse maltosa, glucosa, galactosa, sacarosa o cualquier otro azúcar fermentable.

20 El producto final de la fermentación puede usarse como forraje para alimento de animales o como fertilizante. Además, el material proteínico hidrolizado puede usarse como alimento de consumo humano o de suplemento alimenticio y como medicina, particularmente en casos geriátricos y pediátricos. En tales casos, es frecuentemente necesario prescribir proteínas específicas o preparados concentrados de órganos internos, por ejemplo concentrados de hígado.

25 Como alimento animal, el producto final puede comprender del 30 al 40% de un alimento equilibrado para pollos, cerdos, etc.

30 Los productos de pescado hidrolizados pueden usarse como base pa



282906

ra insecticidas o agentes para combatir plagas en los que la base fun-
cionará para atraer a los insectos.

5 La sangre hidrolizada puede usarse industrialmente para la pre-
paración de sustancias espumantes tales como las que se emplean en los
extintores de incendios.

10 Durante la hidrólisis, la cantidad de vitamina B₁ y B₁₂ que se
encuentra naturalmente en el material proteínico, tal como en el pes-
cado, resulta incrementada. Como el proceso de fermentación se lleva
a cabo a una temperatura relativamente baja y puede efectuarse en un
recipiente cerrado, no se pierden proteínas, vitaminas ni sales minera-
les. Por el contrario, se añaden al material proteínico, los minerales
e ingredientes de melazas y aquellos que la propia levadura produce.

15 La cantidad de azúcar añadida al material proteínico no es crí-
tica. La cantidad preferida de azúcar puede variar entre el 18 y el
20 % aproximadamente en peso del material proteínico.

20 Hemos decuplicado el poder proteolítico de la levadura *Saccharo-
myces Platensis Proteolytica*, desde el momento que en la actualidad
sólo se necesita un litro de cultivo, con un millón de células viables
para una tonelada de pescado molido, en vez de 100 kilos de pescado
molido.

La temperatura de incubación ha sido modificada porque encontra-
mos que trabaja mejor entre 35-37°C en vez de 22-25°C.

Al aumentar el poder poteolítico, ya no son necesarios 8-10 días
sino que el proceso se desarrolla entre 48-72 horas.

25 En vez de obtener una pasta, ahora por la actual hidrólisis ob-
tenemos un líquido espeso.

Podemos usar cualquier azúcar fermentable excepto la lactosa que
ni fermenta ni asimila la levadura.

30 La mejor proteólisis determina que el producto sea mejor aprove-
chado por el animal, lo que permite bajar el porcentaje de forraje a



282 906

la proporción del 10 al 12 %.

En base al mejor poder proteolítico, también ha sido posible bajar la cantidad de fuente energética, que siendo del 18 al 2 %, ahora puede utilizarse entre el 7 y el 10 %. Cualquier azúcar es utilizable, excepto la lactosa.

REIVINDICACIONES

En resumen, la Patente de Introducción que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Proceso para hidrolizar proteínas, que comprende la inoculación de material proteínico con *Saccharomyces platensis proteolytica* en presencia de un azúcar fermentable a excepción de la lactosa, y la fermentación de la mezcla.

2ª.- Proceso para hidrolizar proteínas, que comprende la inoculación de material proteínico con *Saccharomyces platensis proteolytica* en presencia de un azúcar fermentable, excepto la lactosa, y la fermentación de la mezcla a una temperatura comprendida entre 35 y 37°C.

3ª.- Proceso para hidrolizar proteínas, que comprende la inoculación de material proteínico con *Saccharomyces platensis proteolytica* en presencia de un azúcar fermentable, excepto la lactosa, y la fermentación de la mezcla a una temperatura comprendida entre 35 y 37°C aproximadamente, hasta que se estabiliza el pH entre 5,2 y 5,4.

4ª.- Proceso para hidrolizar proteínas, que comprende la inoculación de material proteínico seleccionado de la clase de pescado, animal, sangre, huevos y mezclas de ellos, con *Saccharomyces platensis proteolytica* en presencia de un azúcar seleccionado del grupo consistente en maltosa, glucosa, galactosa y sacarosa, y la fermentación de la mezcla a una temperatura comprendida entre 35 y 37°C aproximadamente, hasta que se estabiliza el pH entre 5,2 y 5,4, siendo el porcentaje de hidrolisis como mínimo del 60 % en relación con el material proteínico tratado.



282906

5º.- Proceso para hidrolizar proteínas, que comprende la inoculación de material proteínico con *Saccharomyces platensis* proteolytica en presencia de melazas, y la fermentación de la mezcla.

5 6º.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: "PROCESO PARA HIDROLIZAR PROTEINAS".

Todo tal y como se describe y reivindica en la presente Memoria, que consta de once páginas escritas a máquina.

Madrid, 28 Noviembre 1962

10 ALFONSO UNGRIA

pp.

15

20

25

30