

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	12
21	483819	13
22	FECHA DE PRESENTACION	
	1 SEP. 1979	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCIÓN

30 PRIORIDADES:	31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
	9295/78-6	4 Septiembre 1978	SUIZA.-
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
	A23P 1/00; A23K 1/00		
64 TITULO DE LA INVENCIÓN			
"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS, PRODUCTOS ALIMENTICIOS ESTIMULANTES Y PIENSOS POBRES EN AMINAS".			
71 SOLICITANTE (S)			
Emil UNDERBERG, German.			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE			
Industriestrasse 31 - 8305 Dietlikon, SWIZA.-			
72 INVENTOR (ES)			
Andreas Lembke.			
73 TITULAR (ES)			
74 REPRESENTANTE			
DON JOSE LOPEZ CORTES.-			

M E M O R I A D E S C R I P T I V A
= = = = =

El presente invento se refiere a un procedimiento para la producción de alimentos, productos alimenticios estimulantes y piensos que son pobres en aminas ó completamente libres en aminas biogenas, en particular de histamina.

5

En los ultimos años se han emprendido esfuerzos cada vez mas fuertes, para disminuir lo mas ampliamente posible en los alimentos, productos alimenticios estimulantes y piensos el contenido de sustancias nocivas para la salud, como por ejemplo medios de protección de plantas, metales pesados, micotoxinas, nitrosaminas y otros carcinogenos, y en el caso ideal mantener los alimentos, productos alimenticios y piensos completamente libres de tales sustancias. En los piensos es por ello tan importante especialmente de mantenerlos en lo posible libres de materias nocivas, porque las materias nocivas pueden acumularse tanto en los tejidos de los animales, o sea pues en la carne, como tambien ocurre frecuentemente un incremento de las materias nocivas en la leche de los animales, o sea pues en particular en la lecha de vaca y en los productos producidos de ella.

10

15

20

Se sabe que la ingestión de determinados alimentos, especialmente de determinadas bebidas alcoholicas como vino y cerveza, así como de queso y también de col fermentada puede conducir a jaquecas y dolores de cabeza, y que tales alimentos y productos alimenticios estimulantes son indigestos

../..

para personas que sufren de alergias, diarreas así como de úlceras estomacales y duodenales.

Investigaciones que se han realizado en relación con estos efectos mencionados en cerveza, parecen demostrar, que tipos de fermentación alta producen mas frecuentemente trastornos que tipos de fermentación baja. A pesar de ello depende la fuerza de los trastornos, mas de la cantidad de cerveza consumida que del tipo de cerveza elegido (Pilsen, Export etc). Sorprendentemente se ha demostrado que en cervezas con el mismo contenido de alcohol, de aceite de fusel y de materias de extracto de lúpulo, pueden ser fuertemente variables los efectos indeseables mencionados. Sin embargo se ha demostrado que cervezas con alto contenido de albumina y de contenido de acido amidico son mas indigestas que cervezas con menor contenido de albumina.

Aminas biogenas entran en el alimento casi siempre solo durante la elaboración de productos primarios agricolas. Tal amina biogena es la histamina.

Se ha demostrado ahora que numerosos microbios estan en condiciones de descarboxilar la histidina que se presenta en productos primarios agricolas en la amina biogena histamina.

La histamina es una sustancia que provoca ya en cantidades minimas fuertes reacciones fisiologicas en el hombre, como por ejemplo dolor de cabeza, jaquecas, nauseas y diarrea. Ademas es histamina un factor esencial en alergias y anafilaxia.

La histamina es una base fuerte que forma sales con acidos. La histamina se presenta en plantas, por ejemplo en las espinacas y ortigas, y se encuentra en diversos tejidos animales y humanos. Los leucocitos basofilos acumulan histamina en forma inactiva, sin embargo puede ser liberada de estos mediante reacciones alergicas ó radiación ionizante ó en destrucción del tejido ó tambien por liberadores.

Se supone tambien que exista una estrecha relación entre el contenido de histamina de la mucosa gastrica, la recidiva del ulco y del acido gastrico. Mediante la administración de antagonistas receptores de histamina se pueden mejorar de una manera significativa ulceras estomacales cronicas. Lo mismo vale tambien para la jaqueca. Para la profilaxis de la jaqueca es de gran importancia una alimentación libre de histamina de facil digestión.

Personas con ulcera duodenal cronica almacenan de una manera significativa menos histaminas en la mucosa corpuscular, que personas con el estomago sano. Mientras que personas sanas desintegran la histaminas suministrada con el alimento mediante una histaminasis, se llega por la falta de este fermento a dolor de cabeza histaminica (síndrome de Horton), que se llama tambien cefalgia histaminica. Tambien el síndrome de dolor de cabeza Bing y la neuralgia de Harris, un trastorno que se presenta mas fuertemente casi siempre a determinadas horas del dia, en especial por la noche mediante ataques de dolor del lado medio en la región del ojo, frente, sienas, con lagrimeo, enrojecimiento del ojo y de la cara,

hinchazón de la mucosa nasal etc. es provocado por histamina y se puede tratar ventajosamente con antihistaminicas.

5 La desensibilización y producción de una resistencia incrementada contra la histamina se logra por la administración de histaminasoproteína. Normalmente se encuentra en el suero un factor antihistaminico cuya falta se conceptua como signo de una alergia latente.

La separación de la histamina se efectua por las heces y con la orina.

10 La histamina aumenta la contracción de la musculatura lisa y hace perder fuerza a los musculos vasculares. De este modo se disminuye la presión sanguinea pero se aumenta la permeabilidad capilar de modo que se llega a la formación de granos y edemas en la piel. El suero humano puede ligar histamina libre. Solo en el alergico esta fuertemente disminuida la capacidad de ligazón, es inhibida por una llamada antipexina.

15 Como limite de tolerancia peligrosa para la salud considera Marquardt (vease H.Marquardt, "Die Weinwirtschaft", pag.127, 1978)

20 2 mg de histamina por kilo de alimentos ó productos alimenticios, por ejemplo vino.

Ahora se han examinado diversos alimentos y productos alimenticios por su contenido en histamina. En productos lecheros se han obtenido aqui los resultados resumidos en la Tabla I siguiente:

25

TABLA I

Contenido de histamina en diversos productos lac-

teos

	<u>Producto</u>	<u>Histamina mg/kilo</u>
5	Leche sin desnatar pasteurizada	0,3
	"	0,5
	"	0,7
	Leche sin desnatar H (uperizada)	0,8
	"	0,8
10	Leche cuajada	1,2
	Yoghurt	2,1
	Yoghurt	1,7
	Queso grasa plena Tilsit	50,0
	"	60,2
15	Queso Gouda grasa plena	54,0
	Queso Gouda grasa plena austriaco	41,0
	Queso Gouda grasa plena holandés	180,0
	Camembert grasa plena	35,0
	Camembert grasa plena	55,0
20	Stilton grasa plena inglés	158,0
	Queso del Harz	390,0
	Queso del Harz estilo granjero	383,0

Como se verá de esta tabla, este es el contenido de histamina de las diversas clases de leche sin desnatar claramente por debajo del límite de tolerancia indicado por

25

.../...

Marqueardt. De por si es sorprendente que leche fresca presenta ya cierta cantidad de histamina. Se puede suponer que hay que atribuir este contenido de histamina de la leche fresca por lo menos en parte, a que las vacas toman con los piensos y especialmente del pienso ensilado, la histamina y esta pasa a la leche. Como se verá ademas de la tabla I es sin embargo el contenido de histamina de productos de leche agria, como yoghurt y de quesos esencialmente, mas elevado que aquel de leche fresca. Puesto que los microorganismos estan en condiciones, como se ha mencionado ya mas arriba, de transformar la histidina contenida en la albumina de la leche mediante descarboxilación en histamina, se presenta este incremento drastico de contenido de histamina en la acidificación de la leche y en la producción de queso. Al consumir solo 50 g de queso de Harz estilo gramjerc se toman ya casi 20 mg de histamina, o sea puse el decuplo que Marqueardt considera como limite de tolerancia para 1 kilo de bebida, como vino.

Tambien los vinos presentan un contenido de histamina bastante elevado, y especialmente el vino tinto y champagne. Tambien en este caso se forma la histamina, como se discutirá aun con mas detalle mas adelante, porque se transforma la histidina de materias albuminosas que estan contenidas en el mosto ó en la materia macerada, por microorganismos en histamina. Los resultados logrados en el examen de vino se ha resumido en la Tabla II siguiente.

TABLA II

Contenido de histamina de diversos vinos

	<u>Producto</u>	<u>histamina mg/kilo</u>
	Vino de mesa (Mosela)	0,5
5	Vino de mesa (Francia)	1,6
	Vino de calidad (Mosela)	1,1
	Vino Cabinet (Renania-Hessen)	3,0
	Vino Cabinet (")	4,5
	Vino especial (región vinícola del Rhin	1,7
10	Vino tinto (Ahr)	5,6
	Vino de Tokay (Hungria)	1,1
	Vino de Tokay, seco (Hungria)	3,2
	Vino tinto (Austria)	7,4
	Champan, seco (Alemania)	5,1
15	Champan(Francia)	7,8

En las investigaciones de cerveza se ha determinado que, como se ha indicado mas arriba, las cervezas ricas en albumina son mas indigestas que aquellas con poco contenido de albumina ó aminoacido. El examen del contenido de histamina en estas cervezas dió por resultado que las cervezas ricas en albumina son también especialmente ricas en histamina, y que incluso cervezas libres de alcohol pueden presentar contenidos en histamina relativamente altos.

En la Tabla III siguiente se han resumido los contenidos de histamina de diversas cervezas, y se indican en

esta Tabla también los números de prueba.

TABLA III

Contenido en histamina de diversas cervezas.

No.	<u>Tipo de cerveza</u>	<u>histamina mg/1</u>
5	1 Cerveza vieja	4,5
	2 " vieja	9,8
	3 " vieja	8,0
	4 " vieja	6,8
	5 " vieja	5,0
10	6 " blanca	5,3
	7 " blanca	4,9
	8 " blanca	4,0
	9 " blanca	4,7
	10 Cerveza de malta	6,8
15	11 " sin alcohol	7,5
	12 " sin alcohol	4,6
	13 " Export	3,2
	14 " Export	2,9
	15 " Export	11,2
20	16 " Export	7,0
	17 " Export	6,6
	18 " Export	7,2
	19 " Pilsen	3,5
	20 " Pilsen	0,2
25	21 " Pilsen	7,4
	22 " Pilsen	5,8
	23 " Pilsen	5,2
	24 " Pilsen	5,9
	25 " Pilsen	6,7

Sorprendentemente se ha encontrado ahora que se puede disminuir esencialmente el contenido de alimentos, productos alimenticios estimulantes y piensos de aminas biogenas nocivas, en particular el de histamina, añadiendo durante cualquier etapa de la producción de alimento, productos alimenticios estimulantes o piensos, un microorganismo ó un fermento por el que se transforma la histidina contenida en el material de partida en productos inofensivos y no se transforma en la histamina nociva.

El objeto del presente invento es por tanto un procedimiento para la fabricación de productos alimenticios, productos alimenticios estimulantes y piensos que son pobres en aminas biogenas. El procedimiento de acuerdo con el invento se caracteriza en que se añade durante cualquier etapa de la producción del alimento, producto alimenticio ó pienso un microorganismo que causa una transaminación o desaminación de histidina, ó que se añade una enzima que produce la transaminación ó desaminación de histidina.

El microorganismo añadido para la ejecución del procedimiento de acuerdo con el presente invento puede ser una bacteria, preferentemente de la clase de los lactobacilos, de las especies seudonomas y micrococos, un hongo ó una levadura, preferentemente de una especie sacaromica, ó se puede añadir una enzima obtenida de tal microorganismo que

..//..

causa la transaminación ó desaminación de la histidina.

De acuerdo con una clase preferida de ejecución del procedimiento según el invento se produce un alimento, producto alimenticio ó pienso añadiendo durante la producción un microorganismo, ó una enzima, que conduce a una desintegración de histidina contenida en el alimento bajo formación de ácido glutámico, ó acidocetoglutárico, ó sales correspondientes. De esta manera se logra producir alimentos, productos alimenticios estimulantes ó piensos que presentan un contenido fuertemente disminuido de aminas biogénas, en particular de histamina, ó que están prácticamente del todo libres de tales aminas biogénas.

El procedimiento según el invento es de especial importancia allí donde durante la producción de un alimento, medio alimenticio estimulante ó pienso es un paso esencial de producción una transformación producida por microorganismos. Ejemplos para tales transformaciones producidas por microorganismos son la fermentación alcohólica, por ejemplo en la producción de vino ó producción de cerveza, así como además una fermentación de ácido láctico, y también aquellos procesos que se desarrollan en la fabricación del queso. Relacionado con ello hay que llamar especialmente la atención a que la fermentación de ácido láctico no se efectúa solo en relación con la producción de productos de leche agria, como leche agria, yoghurt ó requesón, sino también en la producción de col fermentada y en la producción de pienso ensilado.

Si se aplica el procedimiento según el invento en la producción de un alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso, en la que un paso esencial es una transformación producida por microorganismo, entonces son posibles dos clases de ejecución especialmente ventajosas del procedimiento según el invento.

De acuerdo con una clase de ejecución preferida del procedimiento según el invento se destruye en el material de partida empleado la flora germinal, y a continuación se efectúa la transformación producida por el microorganismo vacunando el material de partida con un cultivo puro correspondiente de microorganismos que causa una transaminación ó desaminación de la histidina contenida en el material de partida.

Si se tiene que efectuar por ejemplo una fermentación de ácido láctico, entonces se puede aislar también cultivos unicelulares de cultivos técnicos correspondientes de lactobacilo helvético ó lactobacilo búlgarico ó lactobacilo ácido-filo, é incrementar estos en un caldo de cultivo apropiado con adición de ácido pantoténico, niacina, riboflavina y calcio. Los cultivos puros reales así obtenidos de los microorganismos antes citados tienen una óptima temperatura de fermentación en la región de 40 - 44°C, estando situadas las temperaturas máximas en las que es posible una fermentación con estos microorganismos en la región de 50 - 52°C. Los cultivos puros arriba mencionados del lactobacilo helvético ó lactobacilo búlgarico, ó lactobacilo ácido-filo respectivamente fermentan glucosa y maltosa

homofermentativamente formando acido lactico d(-), sin embargo sin formar bioxido de carbono. Los microorganismos en cuestion desaminan ademas algunos aminoacidos, y bien histidina, arginina, citrulina, ornitina, prolina é hidroxiprolina liberando amoniaco.

5

En esta relacion hay que señalar explicitamente que un gran numero de cepas de microorganismos, por ejemplo cepas de lactobacilo que se depositan en usuales lugares colectores, estan en condiciones de ejecutar la deseada desaminacion de histidina liberando amoniaco. Si cultivos puros de estas cepas depositadas poseen la mencionada propiedad, entonces son apropiados para la ejecucion del procedimiento segun el invento. Como por ejemplo para una de estas cepas de microorganismos hay que citar M. Rogosa, que en la Colección Alemana de Microorganismos (DSM), Griesebachstrasse 8, 34 Göttingen DT, el numero de registro DSM 20074. Esta cepa de microorganismos esta depositada tambien en la American Type Culture Collection (ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 -EE.UU. y posee alli el numero de registro ATCC 9649.

10

15

20

En la misma forma en que se ha descrito esto arriba para el lactobacilo helvetico y las otras cepas citadas de lactobacilos, se ha producido tambien un "cultivo unicelular" del lactobacilo delbrücki.

25

Si se ejecuta ahora una fermentación de acido láctica con los cultivos unicelulares del lactobacilo asi obtenidos, entonces se transforma ademas de la formación del acido lactico tambien la histidina contenida en el material de

partida despues de un desdoblamiento primario de amoniaco en acido glutamico, y no tiene lugar una transformación indeseable de histidina con desdoblamiento de bioxido de carbono que conduce a la histamina no deseada.

5 Si se vacuna ahora una leche dulce esterilizada con los cultivos unicelulares antes descritos de lactobacilo helvético ó lactobacilo bulgarico ó lactobacilo acidofilo, y se ejecuta la fermentación del acido lactico a una temperatura dentro de la región de 40 - 45°C entonces se obtiene
10 una leche agria que esta practicamente del todo libre de histamina ó cuyo contenido en histamina no es mas elevado que aquel de la leche fresca empleada para la producción de leche agria. En general es ventajosa añadir aun acido pantoténico, niacina y riboflavina para asegurar un optimo de las condiciones de crecimiento durante la fermentación del acido lactico a la leche empleada como material de partida. Una parte constitutiva mineral esencial que necesitan los cultivos puros del lactobacilo helvético ó lactobacilo bulgarico ó del
15 lactobacilo acidofilo para su crecimiento, es calcio. Sin embargo la leche fresca contiene ya cantidades suficientes de calcio de modo que no es necesaria la adición de calcio
20 en la producción de leche agria aqui descrita.

De la leche agria asi obtenida, se puede producir tambien, en caso que se desea, un requesón libre de histamina, y este se puede vender entonces como tal, ó se puede emplear para la producción de determinadas clases de queso, como
25 por ejemplo para la producción de queso de Maguncia ó "Olmützer Quargeln", ó también de queso del Harz.

..//..

El cultivo unicelular del lactobacilo delbrücki obtenido con el procedimiento arriba descrito, fué empleado para producir col fermentada, pepinillos en vinagre y pienso ensilado, con contenido disminuido de histamina o completamente libre de histamina.

5

En la producción de col fermentada se condimenta la col blanca correspondientemente desmenuzada como de costumbre y luego sin embargo no se fermenta por la acción de las bacterias de ácido láctico que se encuentran en ella, sino mediante un tratamiento térmico se destruye la flora germinal existente y a continuación se efectúa la vacunación artificial con la histidina para la cepa del lactobacilo delbrücki que transforma en ácido glutámico, y el material así vacunado se elabora en la forma usual para col fermentada.

10

15

En la misma forma se efectúa también en la producción de pepinillos en vinagre primero una esterilización del material de partida y después una vacunación.

20

25

Como se ha mencionado ya, es de gran importancia el procedimiento según el invento en la producción de pienso fermentado, o sea pues el llamado pienso ensilado. En este caso se esteriliza el pasto verde empleado como material de partida, por ejemplo hierba, alfalfa, maíz, verde y similares, primero mediante tratamiento térmico, y luego se vacuna con el cultivo puro unicelular mencionado del lactobacilo delbrücki y se fermenta en la forma usual en los recipientes herméticos previstos para este fin, o sea pues en los usuales silos para piensos. Del mismo modo se produce pienso ensilado de ensilado premarchitado esterilizando entonces después

de la adición de materias sacaríferas, por ejemplo melaza ó recortes de remolacha, al ensilado premarchitado primeramente esta mezcla y luego se vacuna artificialmente con el mencionado cultivo puro unicelular del lactobacilo delbrücki. El pienso ensilado libre de histamina ó pobre en histamina producido de este modo es muy deseable porque al darlo a comer a vacas se impide que con el pienso para la histamina ingerida a la leche. Al emplear tal pienso ensilado se logra producir leche fresca practicamente libre de histamina.

Si la transformación producida por microorganismos es una fermentación alcoholica, entonces se puede lograr la formación de un producto de fermentación alcoholico libre de histamina en que se esteriliza primero el material de partida y luego se efectua una fermentación correspondiente con esta cepa de sacaromicos que efectua una transaminación ó desaminación de la histidina contenida en el material de partida.

Es posible producir de este modo un vino esterilizando primero el mosto y luego se vacuna con un cultivo puro unicelular de sacaromicos. Con ello se transamina ó desamina en la fermentación alcoholica la histidina existente en el material de partida, y no se transforma en la histamina nociva. Sin embargo puesto que los cultivos puros unicelulares mencionados de sacaromicos frecuentemente no son optimos para la ejecución de la fermentación alcoholica, son mas ventajosas por regla general las formas del procedimiento descritas mas adelante para la producción de vino, en las que se elimina primero la histidina contenida en el material de par-

5 tida por otros microorganismos, y solo luego se efectua la fermentación alcohólica. También la fermentación secundaria en la producción de champán no se efectua por regla general con una cepa de levadura especialmente elegida sino mediante adición de cultivos puros de lactobacilo como se explicará esto igualmente aun en detalle mas adelante.

10 Como se puede ver en la Tabla I, son algunas clases de queso particularmente ricas en histamina. La dificultad en la producción de queso según el procedimiento de acuerdo con el invento reside en que en muchos quesos no es responsable un solo microorganismo para la formación del queso duro especial ó queso blando, sino que pueden colaborar diferentes microorganismos en la producción de una clase especial de queso. Si se quiere producir ahora un queso pobre en histamina de acuerdo con el procedimiento según el invento, entonces se tienen que eliminar de todas las cepas de microorganismos responsables para la producción de la clase especial de queso aquellos cultivos unicelulares que conducen a una transaminación ó desaminación de histidina.

20 El queso Roquefort se produce como es sabido mediante la acción de un determinado hongo esquizomiceto azul por quebrantamiento que se ha efectuado de la leche de oveja mediante precipitación del fermento del cuajo. Mientras que en la producción tradicional de Roquefort se efectua una infección del quebrantamiento con el hongo esquizomiceto azul mediante adición de pan enmohecido, se ha obtenido
25 ahora un cultivo del hongo azul del queso Roquefort, unicelular

lar que conduce a una desaminación de la histidina. El quebrantamiento del queso se ha vacunado luego con este cultivo puro de hongo azul, y con ello se ha logrado producir un queso Roquefort que contiene cantidades solo muy pequeñas de histamina, sin embargo en lo que respecta al gusto era muy parecido despues de la maduración correspondiente al queso Roquefort producido en la forma usual.

Si se quiere producir un alimento, producto alimenticio ó pienso en el que es un paso esencial del procedimiento de producción, una transformación producida por microorganismos, entonces no es absolutamente necesario emplear para esta transformación tal cepa de organismos que conduzca a ninguna descarboxilación de la histidina con formación de la histamina nociva, sino tambien es posible transformar histidina contenida en el material de partida antes en productos inofensivos de modo que en la acción siguiente del microorganismo no existe ninguna histidina en absoluto que se puede transformar mediante descarboxilación en histamina. Según esta segunda forma de ejecución preferida del procedimiento de acuerdo con el invento se produce un alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso según un procedimiento en el que es un paso esencial del procedimiento de producción una transformación producida por microorganismos, por ejemplo una fermentación alcohólica ó fermentación de ácido lactico eliminando antes de la transformación producida por el microorganismo la histidina contenida en el material de partida por la acción de un microorganismo que desamina ó transamina la histidina ó de una enzima que produce una

desaminación ó transaminación de histidina, de modo que en la siguiente transformación esencial del material de partida producida por el microorganismo no existe ya practicamente histidina en este que puede ser transformada por una descarboxilación producida por este segundo microorganismo en histamina. Si por ejemplo el producto a producir es una bebida alcoholica entonces se puede obtener tambien un producto final practicamente libre de histamina destruyendo la flora germinal del material de partida antes de la fermentación alcoholica, añadiendo a continuación un microorganismo ó una enzima que produce una transaminación ó desaminación de la histidina contenida en el material de partida, y luego, tan pronto como se desintegra la histidina existente en productos de transformación inofensivos, se efectua la fermentación alcoholica mediante vacunación con un cultivo de levadura. La cepa de levadura empleada puede ser en este caso tambien una que conduciria a una descarboxilación de histidina bajo formación de histamina, pero puesto que en este momento no existe ya ninguna histidina en el material a fermentar, no puede presentarse ninguna transformación no deseada de la histidina en histamina.

Esta ultima clase de ejecución del procedimiento según el invento es especialmente muy ventajosa en la producción de cerveza porque incluso en aquellas etapas de trabajo que tienen lugar antes de la fermentación alcoholica, puede desarrollarse una transformación producida por microorganismos de histidina en histamina. Ya que a saber la histidina esta contenida en cantidades considerables en la albumina

de cereales, por ejemplo en la albumina de cebada. Según Souci, Fachmann y Kraut, Tablas de valor nutritivo (Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1977) asciende el contenido de histidina en la harina de cebada a 1,4 hasta 2,5 g por kilo de harina de cebada, y el contenido de histidina de cebada descascarillada con un contenido de proteina de 97 hasta 133 g por kilo corresponde a aproximadamente 1,8 g por kilo. Durante la preparación de malta tiene lugar una proteolisis de la albumina de cereal en la cuba de macerar y en la cuba cervecera. Además existen en este momento ya microorganismos, como por ejemplo Sacaromicos diastaticos, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus pastorianus y Pediococcus cerevisias que pueden conducir a una descarboxilación de la histidina bajo formación de histamina. En los microorganismos en cuestión no se trata en este caso naturalmente de cepas existentes en los alrededores naturales que, como se ha explicado ya anteriormente, conducen generalmente a esta descarboxilación no deseada de la histidina.

Esta descarboxilación condicionada por microbios de la histidina bajo formación de histamina nociva se puede interrumpir en la preparación de cerveza solo al final del proceso de malteaje mediante inactivación termica, pero no en el transcurso de la fermentación primaria ó durante la maduración. Microbios entrados en las cubas de fermentación que producen una descarboxilación de histidina, para lo que estan en condiciones tambien numerosas razas de sacaromicos cerevisias, hacen formar asi considerables cantidades de histamina.

..//..

Sorprendentemente ha resultado ahora que se puede producir una cerveza libre de histamina efectuando ya antes de la fermentación alcohólica una inactivación térmica de la flora germinal de la malta remojada, y luego se desintegra la histidina contenida en este material de partida añadiendo a la malta remojada el cultivo puro unicelular del lactobacilo delbrücki descrito ya antes en relación con la fermentación del ácido láctico.

La esterilización de la malta remojada con anterioridad a la adición del cultivo puro del lactobacilo delbrücki se logra convenientemente calentando este durante 30 a 40 minutos a una temperatura en la región de 62°C hasta 65°C. A continuación se enfría entonces la malta remojada a 45°C y a esta temperatura se vacuna con el cultivo puro del lactobacilo delbrücki. En la malta remojada así tratada tiene lugar por el lactobacilo delbrücki una transformación homofermentativa fuerte de glucosa y maltosa bajo formación con ácido láctico, y al mismo tiempo se transforma la histidina presente después de desdoblamiento primario de amoníaco en ácido glutámico. Durante este paso se controla permanentemente el progreso de la formación de ácido láctico y la transformación de la histidina en ácido glutámico que transcurre paralelamente a ello.

Tan pronto como después de la conclusión y la acidificación de la malta remojada se transforma la histidina existente muy ampliamente en 1-ácido glutámico, se ejecuta la fermentación principal, es decir la fermentación alcohólica de la cerveza por adición de levadura, es decir

añadiendo *saccharomyces cerevisiae*. Convenientemente se efectua esta fermentación alconolica vacunando con un cultivo puro de levadura que metaboliza parcialmente tanto el amoniaco formado en la desintegración de la histidina como tambien el acido glutamico formado de la histidina, y tambien el acido lactico formado por el *lactobacilo delbrücki*. Debe efectuarse pues la fermentación alcohólica con una cepa tal de *saccharomyces cerevisiae* que desintegre los productos secundarios formados anteriormente por el *lactobacilo delbrücki* de nuevo de forma optima. En la forma descrita se logra producir una cerveza libre de histamina. Si se aplica este procedimiento a la producción de una cerveza sin alcohol, entonces se puede obtener también esta libre de histamina.

Con gran ventaja se efectua la transformación previa de histidina en amoniaco y acido glutamico tambien en la producción de otros productos alcohólicos, por ejemplo vino y licores, y se obtiene entonces igualmente productos alcohólicos libres de histamina ó productos secundarios producidos de ellos, por ejemplo vinagre libre de histamina.

En la producción de vino libre de histamina según la forma de ejecución del procedimiento de acuerdo con el invento relatado en ultimo lugar, se efectua, analogamente a la producción de cerveza, primero una esterilización termica del mosto para destruir germenos primarios no deseados. A continuación se vacuna entonces el mosto ó la malta remojada con una pequeña cantidad del cultivo puro unicelular del *lactobacilo delbrücki* u otros *lactobacilos* apropiados, y se deja entonces el material a la temperatura optima de fermenta-

ción de estos microorganismos en la región de 40 -45°C tan-
to tiempo hasta que se ha transformado la histidina conteni-
da en el mosto, ó en la malta remojada respectivamente, en
amoníaco y ácido glutámico. También en este caso forma el
5 lactobacilo delbrücki ó las otras clases de lactobacilo añadi-
das ácido láctico por la fermentación de hidratos de carbo-
no. Tan pronto haya tenido lugar la desintegración deseada
de histidina, se efectúa entonces la fermentación principal,
es decir la vacunación con un cultivo puro de levadura emplean-
10 dose también en este caso una cepa de sacaromicas cerevisias
que metaboliza en forma óptima aparte de la fermentación al-
cohólica también lo más ampliamente posible el amoníaco for-
mado, así como el ácido glutámico y ácido láctico.

La forma de proceder arriba mencionada se puede
15 aplicar también con ventaja en la producción de licores, ó
sea pues bebidas alcohólicas destiladas. Aunque en una des-
tilación ejecutada limpiamente no se arrastran por regla ge-
neral cantidades esenciales de histamina en la destilación
al destilado, ha resultado no obstante que licores obtenibles
20 en el comercio, como coñac y similares, contienen frecuentemente
grandes cantidades de histamina.

También en este caso se puede transformar la histi-
dina existente en productos secundarios inofensivos o bien
por la selección de una cepa especial de levadura, o por
regla general aun con más ventaja, antes de la fermentación
25 alcohólica mediante tratamiento con un cultivo puro del lac-

tobacilo delbrücki, u otro cultivo puro de lactobacilo.

5 Conforme con otra forma de ejecución del procedimiento de acuerdo con el invento, se puede impedir la formación de histamina en transformaciones producidas por microorganismos tambien allá donde normalmente no estan con-
tenidas cantidades esenciales de histamina, sin embargo se forma entonces histidina de celulas muertas del microorganismo por cuya acción se efectua la transformación en el alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso.

10 Un procedimiento tipico durante cuya ejecución solo se forma histidina, es la producción de champan. En la producción de champan se añade, como es sabido, a un vino obtenido por fermentación primaria una mezcla de sacarosa y levadura, y se efectúa en un recipiente cerrado, por ejemplo en un deposito de presión ó una botella cerrada, entonces
15 la fermentación secundaria. En el se fermenta la sacarosa con ayuda de la levadura formando alcohol, y el bioxido de carbono formado con ello queda disuelto en el champan bruto. Un proceso no deseado, que se desarrolla en la producción de champan, es aquel que se descarboxila la albumina procedente de la levadura, ó la histidina procedente de esta albumina, luego por las celulas que siguen con vida para formar
20 histidina. Como se ve en la Tabla II representada mas arriba, presenta el champan frances a razón de esta desintegración de albumina bajo formación de histamina un contenido considerablemente mas elevado de histamina que los valores
25 promedio usuales para vino.

..//..

Si se emplea el procedimiento según el invento para la producción de un vino espumoso libre de histidina, entonces se añade al vino obtenido por fermentación primaria una mezcla de uno de los cultivos puros de lactobacilos mas arriba descritos que conducen a una desaminación de la histidina, junto con sacarosa y la levadura. En la fermentación secundaria que se desarrolla en el recipiente de presión, se desamina entonces la histidina procedente de la levadura por el lactobacilo presente enseguida al formarse. Con ello no hay ya disponible histidina para las células de levadura vivas que puede ser descarboxilada en histamina nociva. Con este modo de procedimiento se logra producir un vino espumoso practicamente libre de histamina.

De los cultivos puros de microorganismos que conducen a una transaminación ó desaminación de la histidina, se ha aislado el complejo de fermento responsable para esta transformación. Para ello se han destruido mecanicamente las células que aíslan y liofilisan el líquido que contiene el complejo de fermento. Resultó que 10^{-3} g del material de fermento así contenido esta en condiciones de desintegrar 1g de histidina. Se ha empleado el complejo de fermento así obtenido en la misma manera como se describe esto anteriormente en detalle para el cultivo puro del lactobacilo delbrücki, para desintegrar en un material de partida la histidina en productos inofensivos. Se han obtenido aquí resultados analogos como en el empleo del cultivo puro de lactobacilo delbrücki.

La histidina es de por si un aminoacido esencial, es decir un aminoacido que debe tomar el hombre con el alimento. En cuanto los alimentos producidos de acuerdo con el procedimiento según el invento son ricos en albumina, como por ejemplo productos de leche agria ó queso, no se produce un alimento completamente libre de histidina por la elección de una cepa especial de microorganismos, sino se impide unicamente que la cepa de microorganismos lleve a cabo una descarboxilación no deseada de histidina con formación de histamina. En cuanto se desintegra histidina por la cepa de microorganismos, se transforma como ya se ha explicado con anterioridad en detalle, por ejemplo en acido glutamico inofensivo.

Sin embargo si el alimento producido conforme con el procedimiento según el invento no es un proveedor esencial de proteínas, como esto es el caso por ejemplo en las bebidas alcoholicas, entonces no existen naturalmente inconvenientes de ninguna clase en eliminar completamente pequeñas cantidades de histidina contenidas en estos productos, porque los albuminoides necesarios para la alimentación tienen que ser suministradas al cuerpo humano de todas formas por otras fuentes, por ejemplo carne, huevos y productos lacteos.

El procedimiento según el invento se va a explicar ahora a base de un ejemplo.

Ejemplo: Producción de una cerveza practicamente

libre de histidina.

5 En la fabricación de una cerveza según los procedimientos empleados hasta ahora se ejecutan tres procesos esencial de trabajo (vease por ejemplo la explicación de la fabricación de cerveza en el "Lehrbuch der chemischen Technologie" de DST-RASSOW, edición 1965, y precisamente en las paginas 1394-1405, Johann Ambrosius Barth, Editorial Leipzig).

10 1. Preparación de malta: La principal materia bruta para la cerveza, a saber la cebada, no contiene primero ningun extracto fermentable. Se deja fermentar la cebada en la malteria formandose enzimas que transforman el almidón insoluble en agua del grano en azucar soluble. Por las enzimas formadas al germinar se transforman tambien otras materias altamente moleculares en bajas moleculares. A continuación se seca la cebada germinada formandose colorantes y materias aromaticas.

15 2. Fabricación de cerveza: Se tritura la malta y se trata con agua caliente (macerar). En ello se disuelven cantidades ya existentes de combinaciones solubles. Otro almidón se transforma enzimaticamente en la maltosa soluble. Despues de la filtración del condimento se hierve este añadiendo el lupulo y se evapora en ello mas o menos agua. Se separa el condimento caliente del lupulo.

20 25 3. Fermentación: Despues de la separación de lupulo tiene que enfriarse el condimento caliente en breve tiempo a una temperatura de fermentación de 5 hasta 7°C en la fabricación de cervezas de fermentación baja ó a una

temperatura de 14 hasta 16°C en la fabricación de cervezas de fermentación alta. La levadura de cerveceria se añade y se fermenta a las temperaturas indicadas por regla general durante ocho a diez días. La cerveza así obtenida se somete entonces a la fermentación posterior en bodegas de envejecimiento y finalmente es liberada de la levadura por filtración y se envasa.

5

El procedimiento conocido hasta ahora en la fabricación de cerveza se transforma de acuerdo con el invento en la producción de cerveza libre de histamina como sigue:

10

Se ha comprobado sorprendentemente que la superficie del grano transformado en malta, contiene ya numerosos microbios. Estos conducen a que en el proceso de maceración en presencia de agua no solo se efectúa la transformación deseada del almidón insoluble en azúcar soluble, sino también que se descarboxila en histamina la histidina abundantemente existente en la albumina del cereal por estos microbios. Además se ha demostrado que estos microbios no deseables son sensibles al calor.

15

20

En el procedimiento según el invento se libera por tanto la superficie de la cebada germinada de los microbios molestos blanqueandola ó sumergiendola 10 minutos en agua con una temperatura de 75 hasta 100°C. Se elimina el agua y se enjuaga varias veces con agua de 50 grados.

25

A continuación se muele bastante la malta como en los procedimientos hasta ahora conocidos y se lleva a cabo como usualmente el proceso de maceración y también la

adición de lupulo y el hervido del condimento se efectuan como en los procedimientos tradicionales.

5 Otro paso esencial del procedimiento según el invento consiste en que se efectua el enfriamiento del condimento filtrado del lupulo en refrigeradores absolutamente puros, desinfectados, abiertos ó cerrados con lo que se impide una nueva infección con microbios en este proceso de refrigeración que pueden producir una descarboxilación de histidina aun existente formando histamina.

10 Tambien al ajustar el condimento al contenido deseado de extracto debe emplearse agua impecablemente esterilizada.

15 Se efectua la vacunación empleando un cultivo unicelular comprobado de sacaromices cerevisiae que no produce descarboxilación de histidina.

R E I V I N D I C A C I O N E S

=====

5 1.- Procedimiento para la producción de alimentos, productos alimenticios estimulantes y piensos que son pobres en aminos biogénicos, caracterizado en que se añade un microorganismo durante cualquier etapa de la producción del alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso que causa una transaminación ó desaminación de histidina, ó que añade una enzima que produce la transaminación ó desaminación de histidina.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado en que el microorganismo añadido es una bacteria, preferentemente de la clase de los micrococcos, de las especies pseudomonas y lactobacilos, un hongo ó una levadura, preferentemente de una especie sacaromica, ó que se añade una enzima obtenida de tal microorganismo que produce la transaminación ó desaminación de histidina.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado en que se produce un alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso que presenta un contenido fuertemente disminuido en aminos biogénicos ó que está completamente libre de aminos biogénicos, en particular de histamina, añadiendo un microorganismo ó una enzima que conduce a una desintegración de histidina contenida en el alimento bajo la formación de ácido glutámico, ó ácido catoglutárico respectivamente, ó sales correspondientes.

../.

4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado en que se produce un alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso siendo un paso esencial del procedimiento de producción una transformación producida por microorganismos, por ejemplo una fermentación alcohólica ó fermentación de ácido láctico, realizando la transformación con un cultivo de microorganismos que conduce a una transaminación ó desaminación de la histidina contenida en el alimento.

5.-Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 4, caracterizado en que se produce un alimento, producto alimenticio estimulante ó pienso, siendo un paso esencial del procedimiento de producción una transformación producida por microorganismos, por ejemplo una fermentación alcohólica ó fermentación de ácido láctico eliminando antes de la transformación producida por el microorganismo histidina contenida en el material de partida ó eliminando histidina formada durante la transformación producida por el microorganismo como producto secundario mediante la acción de un microorganismo que desamina ó transamina histidina ó de una enzima que produce una desaminación ó transaminación de histidina, de modo que en la transformación esencial siguiente producida por un microorganismo del material de partida no existe en este ya prácticamente histidina, o se deposita lo que puede ser transformada en histamina por una descarboxilación de histidina producida por este segundo microorganismo.

5
10

6.- Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado en que se produce una bebida alcohólica, por ejemplo cerveza, vino ó licores, o un producto secundario sin alcohol obtenido de un producto producido de una fermentación alcohólica, por ejemplo cerveza sin alcohol ó vinagre, destruyendo la flora germinal antes de la fermentación alcohólica del material de partida y se efectúa la fermentación alcohólica mediante vacunación de un cultivo de levadura, en particular de un cultivo puro de una especie sacaromícosa que produce también una transaminación o desaminación de la histidina contenida en el material de partida.

15
20
25

7.- Procedimiento según la reivindicación 5 caracterizado en que se produce una bebida sin alcohol, por ejemplo cerveza, vino ó licores, o un producto secundario sin alcohol obtenido de un producto producido por la fermentación alcohólica, por ejemplo una cerveza sin alcohol o vinagre de mesa, destruyendo la flora germinal del material de partida antes de la fermentación alcohólica, añadiendo después un microorganismo ó una enzima, que causa una transaminación o desaminación de la histidina contenida en el material de partida, y efectuando después de haber realizado la desintegración de la histidina la fermentación alcohólica mediante vacunación con un cultivo de levadura, que en caso dado puede ser también un cultivo de levadura que descarboxila la histidina presente en histamina.

8.- Procedimiento según la reivindicación 7 caracterizado en que el microorganismo empleado para la desintegración de histidina es un cultivo puro de un lactobacilo, es-

5 pecialmente un cultivo puro de lactobacilo delbrücki que forma ácido láctico, y que transforma la histidina formada por proteólisis en ácido glutámico ó ácido etoglutarico ejecutando luego después de la transformación efectuada de la histidina la fermentación alcohólica mediante vacunación con un cultivo puro de levadura que desintegra por lo menos parcialmente amoníaco y ácido glutámico, así como el ácido láctico formado por el lactobacilo.

10 9.- Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado en que se produce un alimento, producto alimenticio estimulante o pienso en el que un paso esencial del procedimiento de producción es una fermentación de ácido láctico, por ejemplo un producto de leche agria, yoghurt, queso fresco, una col fermentada ó un pienso ensilado destruyendo la
15 flora germinal del material de partida y ejecutando la fermentación del ácido láctico mediante vacunación con un cultivo puro de lactobacilo que transforma la histidina contenida en el material de partida en ácido glutámico, por ejemplo con un correspondiente cultivo puro de lactobacilo delbrücki.

20 10.- Procedimiento según la reivindicación 4 o 5 caracterizado en que el producto alimenticio producido es un queso destruyendo la flora germinal en el queso fresco empleado para la producción de queso como material de partida o en el coagulado lácteo producido por adición de fermento de cuajo, y efectuando la producción de queso mediante vacunación
25 con por lo menos un cultivo puro de microorganismos que causa una transaminación o desaminación de la histidina contenida en el material de partida.



11.-"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS,
PRODUCTOS ALIMENTICIOS ESTIMULANTES Y PIENSOS POBRES EN AMI-
NAS".

De conformidad en un todo en lo esencial y fines
industriales a lo descrito en la precedente memoria descrip-
tiva.

Esta memoria consta de TREINTA Y CUATRO hojas es-
ceitas o mecanografiadas por una sola cara a doble espacio.

Madrid 1 Septiembre 1979

Por autorización del interesado.

JOSE LOPEL CORTES
P.P.