

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 349**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)  
**C05F 5/00** (2006.01)  
**C12N 1/16** (2006.01)  
**C09K 17/16** (2006.01)  
**C09K 17/32** (2006.01)  
**C05C 9/00** (2006.01)  
**C12N 1/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2010 PCT/JP2010/054342**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104197**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2010 E 10750943 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2407546**

54 Título: **Método para producir una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos que tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mv o menos**

30 Prioridad:

**13.03.2009 JP 2009061841**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.08.2018**

73 Titular/es:

**ASAHI GROUP HOLDINGS, LTD. (100.0%)  
23-1, Azumabashi 1-chome Sumida-ku  
Tokyo 130-8602, JP**

72 Inventor/es:

**KITAGAWA TAKANORI;  
IWABUCHI CHIKAKO;  
HONMA DAIKI y  
MAEKAWA YOSHIO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 677 349 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

Método para producir una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos que tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos

### Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un método para producir una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida al someter un microorganismo a un tratamiento hidrotérmico.

### Antecedentes de la técnica

10 La levadura residual descargada de las plantas de producción de alimentos, tales como las cervecerías, se somete a tratamientos de desecho por incineración o similares, a excepción de parte de la levadura residual que se utiliza como materia prima para los extractos de levadura y preparaciones de levadura, alimentos para ganado, fertilizantes y similares. Mientras tanto, una porción de las paredes celulares de levadura que quedan después de la extracción de los extractos de levadura se descarta principalmente, mientras que la otra porción de las paredes celulares de levadura se usa para alimentos saludables, alimentos para ganado, y similares.

15 Sin embargo, los tratamientos de residuos implican costos de transporte a los sitios de eliminación y los costos de eliminación. Además, en los casos en que la levadura residual se usa para los alimentos, alimentos para animales, fertilizantes y similares descritos anteriormente, los usos convencionales tienen algunas limitaciones en términos de las aplicaciones, la cantidad utilizada y los valores agregados de los productos, cuando se toma en consideración la cantidad de levadura residual generada. Por lo tanto, existen expectativas para un material tratado que se puede usar para nuevas aplicaciones, puede aumentar la cantidad utilizada y tiene valores agregados más altos, y para un método de tratamiento de estos.

20 La literatura de patentes 1 describe un método para obtener una sustancia intracelular mediante la destrucción de células con vapor de alta presión a alta temperatura, y muestra a las levaduras como un microorganismo preferido. Dado que la reacción se lleva a cabo en una región de baja temperatura, que es una región de reacción de ionización, la descomposición en sustancias de bajo peso molecular apenas tiene lugar, y la cantidad de sustancias reductoras producidas es muy pequeña. Por lo tanto, es difícil mantener el potencial intrínseco dentro de una región reductora.

25 La literatura de patentes 2 describe un método para obtener una fracción soluble en agua de las paredes celulares de un microorganismo mediante el uso de agua a alta temperatura y alta presión a una temperatura mayor de 100 °C y a una presión no superior a la presión de vapor de saturación a la temperatura, y muestra la levadura como el microorganismo. La fracción soluble en agua obtenida por el método tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos inmediatamente después de ser obtenido, pero pronto el potencial de oxidación-reducción se convierte en 0 mV o más.

Lista de citas

Literaturas de patente

Literatura de patente 1: Publicación de solicitud de la patente japonesa N° Sho 62-224281

35 Literatura de patente 2: Publicación de solicitud de la patente japonesa N° 2005-185187

### Compendio de la invención

40 La presente invención se ha realizado a la vista de las circunstancias descritas anteriormente, y un objeto de la presente invención es proporcionar un método de tratamiento que permite la conversión de un microorganismo, particularmente levadura residual en un material tratado que tenga un alto valor agregado y proporcionar el material tratado.

45 La presente invención proporciona un método para producir una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos que tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos, el método que comprende someter una levadura o un extracto de levadura a un tratamiento de vapor sobrecalentado en la presencia de ácido silícico o un silicato, donde el tratamiento de vapor sobrecalentado se realiza en ausencia de oxígeno con vapor sobrecalentado a una presión de 0,9 MPa a 1,9 MPa a 150 °C a 210 °C.

Además, se describe una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos que tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos se obtiene por cualquiera de los métodos de producción.

50 Además, la presente descripción proporciona una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos que tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos, donde un aumento en el potencial de oxidación-reducción 14 días después de la preparación de dicha mezcla es 40% o menos de un potencial más bajo.

Además, se describe una composición que comprende la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos.

Además, se describe una composición mejoradora de calidad del suelo que comprende la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos.

5 Además, se describe una composición mejoradora de la resistencia a las enfermedades de las plantas que comprende la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos.

Además, se describe un promotor de crecimiento vegetal que comprende la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos.

10 La sustancia reductora obtenida por la presente invención tiene una capacidad reducida. En consecuencia, cuando se usa la sustancia reductora para plantas agrícolas, la sustancia reductora se puede introducir en un estado cercano al potencial de reducción de la oxidación en las células, de modo que se puede esperar un aumento de la funcionalidad de la sustancia. La sustancia reductora también se puede usar para la tecnología de inundación, que es una de las tecnologías de esterilización del suelo. Además, dado que la sustancia reductora tiene actividades antioxidantes tales como la inhibición de SOD, se puede esperar que la sustancia reductora se aplicará a agentes antienviejamiento para la piel, y similares, mediante la utilización de la capacidad antioxidante.

### 15 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo de la temperatura dentro de un reactor debido al vapor sobrecalentado en el Ejemplo 1.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo de la presión dentro del reactor debido a al vapor sobrecalentado en el Ejemplo 1.

20 La Fig. 3 es una fotografía que muestra los resultados de una prueba para investigar un efecto sobre la resistencia a enfermedades de plantas del Ejemplo 2.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo del potencial de oxidación-reducción de un material fertilizante líquido en el Ejemplo 3.

25 La Fig. 5 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo del potencial de oxidación-reducción del suelo en un estado de inundación en el Ejemplo 4.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH de una mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza en el Ejemplo 6.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de SOD de la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza en el Ejemplo 7.

30 La Fig. 8 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo del potencial de oxidación-reducción de la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza en el Ejemplo 8.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo del potencial de oxidación-reducción de un microorganismo anaeróbico y el de los mohos de Koji y mezcla reductora obtenida a partir de levadura de Shochu en el Ejemplo 9.

35 La Fig. 10 es un gráfico que muestra el cambio con el tiempo del potencial de oxidación-reducción de un material tratado en el Ejemplo comparativo 2.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la comparación de las motilidades de los nematodos en el Ejemplo 12.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra la comparación de los pesos de parte comestible de *Molokheiya* en el Ejemplo 13.

40 La Fig. 13 es un gráfico que muestra la comparación de los pesos de parte comestible de Garland chrysanthemum en el Ejemplo 14.

La Fig. 14 es un gráfico que muestra la comparación de los rendimientos de tomate cherry en el Ejemplo 17.

### Descripción de las realizaciones

45 El microorganismo utilizado en la presente invención es una levadura o un extracto de levadura, y las levaduras que se han ingerido y similares son preferibles desde el punto de vista de la seguridad. Cuando las levaduras se utilizan para fertilizantes, alimentos para animales, alimentos, bebidas, suplementos, medicamentos y similares, se puede esperar que los consumidores acepten estos productos fácilmente debido a la alta seguridad. Como levaduras, se puede usar las levaduras cultivadas solo para este propósito. Sin embargo, el uso de una levadura obtenida como material residual sobrante de las industrias cerveceras de cerveza, sake, pasta de soja, salsa de soja o similares es ventajoso en términos de reducción en la cantidad de materiales residuales y en los costos de eliminación de residuos.

Por ejemplo, es particularmente preferible una levadura de cerveza, que puede ser suministrada estable e industrialmente.

La forma del microorganismo utilizado puede ser una levadura como un todo. Alternativamente, se puede usar un extracto de levadura o un componente de microorganismo tal como, por ejemplo, paredes de células de levadura que permanecen después de la producción de un extracto de levadura. El estado de la levadura, el extracto de levadura, las paredes celulares de levadura o similares puede ser cualquiera, y, por ejemplo, el estado puede ser una suspensión, una cuyo contenido de agua se reduce por prensado, uno cuyo contenido de agua se reduce aún más por secado, un polvo, una suspensión o similar. Son preferibles una suspensión de levadura de cerveza, una levadura de cerveza prensada, una levadura de cerveza seca, una suspensión de levadura de cerveza, paredes celulares de levadura seca, una suspensión de pared celular de levadura y un material inorgánico que contiene levadura de cerveza.

En la presente invención, el vapor sobrecalentado se refiere al vapor a una temperatura mayor de 100 °C. En la presente invención, el tratamiento de vapor sobrecalentado se realiza con vapor sobrecalentado a 150 °C a 210 °C. Más aún, el tratamiento de vapor sobrecalentado se realiza con vapor sobrecalentado a 0,9 MPa a 1,9 MPa, con preferencia 1,2 MPa a 1,8 MPa. El tratamiento de vapor sobrecalentado se realiza con preferencia con vapor sobrecalentado a una presión de 1,2 MPa a 1,8 MPa a 150 °C a 210 °C. En la presente invención, el tratamiento de vapor sobrecalentado se realiza en ausencia de oxígeno. Los ejemplos de un método para realizar el tratamiento de vapor sobrecalentado en ausencia de oxígeno incluyen un método en el que el gas dentro de un recipiente de reacción se reemplaza con un gas tal como gas de dióxido de carbono, gas nitrógeno o argón, y similares. En la presente invención, el tratamiento con vapor sobrecalentado se realiza en presencia de ácido silícico o un silicato. Como el ácido silícico o el silicato utilizado, se puede usar un mineral silíceo derivado de diatomeas, que es económico y tiene un volumen de poros estable. El ácido silícico o el silicato utilizado en el tratamiento con vapor sobrecalentado no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen ácido silícico, silicatos y similares, tales como zeolita y arcilla ácida, que se clasifican en este.

La cantidad del ácido silícico o el silicato añadido con preferencia es 1% en p/p a 40% en p/p, y con más preferencia 15% en p/p a 20% en p/p. Cabe señalar que, la cantidad agregada se ajustará según corresponda, de acuerdo con la calidad de la levadura y la concentración de la levadura en el momento de ser utilizada para el tratamiento.

La mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida por el método descrito anteriormente de la presente invención tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos. La mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención con preferencia tiene un potencial de oxidación-reducción de -50 mV o menos. Más aún, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida por el método descrito anteriormente realizado de acuerdo con la presente invención es tal que un aumento en el potencial de oxidación-reducción 14 días después de la preparación de dicha mezcla es 40% o menos de un potencial más bajo. La mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos de la presente invención con preferencia es tal que el porcentaje del aumento en el potencial de oxidación-reducción 14 días después de la preparación de dicha mezcla es 35% o menos, y con más preferencia de modo que el porcentaje del aumento en el potencial de oxidación-reducción 14 días después de la preparación de dicha mezcla es 10% o menos.

Más aún, el potencial de oxidación-reducción de la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención puede ser 0 mV o positivo en el período de inmediatamente después de 1 o 2 días después del tratamiento. Sin embargo, el potencial de oxidación-reducción disminuye gradualmente, cambia a un valor negativo en 3 a 4 días, y permanece estable en un valor negativo.

El potencial de oxidación-reducción en la respiración de las células de eucariotas es alrededor de -180 mV. Por lo tanto, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, que se convierte en una sustancia reductora, tiene una afinidad excelente por el interior de las células, y permite que el componente derivado de levadura actúe efectivamente.

Más aún, debido a que se usa una levadura de cerveza o similar como materia prima, se puede asegurar la estabilidad de la calidad de la materia prima y se puede esperar la conversión en un producto de alto valor añadido. Mediante la adición de una nueva tecnología de producción a las tecnologías básicas acumuladas hasta el momento, tal materia prima se puede aplicar a diversos campos como material reductor.

En el caso del uso en el campo agrícola, un componente derivado de levadura conocido hasta ahora se produce en forma reductora, y se introduce en un estado cercano a un potencial de oxidación-reducción en células de plantas agrícolas. Por lo tanto, se puede mejorar la funcionalidad de la sustancia. Como resultado, es posible obtener efectos tales como la promoción del crecimiento, aumento del rendimiento y mejora de la resistencia a las enfermedades de las plantas.

Más aún, mediante el aprovechamiento de que la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos es una sustancia reductora, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos se puede usar para una tecnología de reducción de inundaciones, que es una tecnología de esterilización de suelo notable. La tecnología de reducción de inundaciones es un método en el cual el agua se mantiene en el suelo como en el caso de un arrozal, y el estado del

- suelo bajo la superficie del agua cambia a un estado reducido de este modo para reducir los patógenos en el suelo. Sin embargo, la tecnología de reducción de inundaciones carece de versatilidad, por ejemplo, porque se necesita una gran cantidad de agua, el agua se debe mantener durante un largo período y la tecnología se puede implementar solo en el período de alta temperatura debido a la mediación de microorganismos. Más aún, la inundación más bien lleva a la proliferación de patógenos en algunos casos. Cuando la sustancia obtenida de acuerdo con la presente invención se usa como una composición mejoradora del suelo, se puede usar la capacidad reductora de la propia sustancia. En consecuencia, es posible controlar el potencial en el suelo a-200 mV o menos, independientemente de la temperatura. Por consiguiente, se puede usar la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención para preparar una composición mejoradora de calidad del suelo. Además en la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, la composición mejoradora de la calidad del suelo puede contener cualquiera de las sustancias húmicas, zeolita, diatomita, silicato de calcio, vermiculita y turba, que se utilizan para la mejora del suelo. Se espera que la mejora del suelo mediante el uso de la composición mejoradora de la calidad del suelo logre efectos tales como la promoción del crecimiento y el aumento del rendimiento.
- En contraste con los materiales reductores proporcionados convencionalmente, el producto tratado tiene una excelente capacidad antioxidante y estabilidad tal que el potencial de oxidación-reducción del producto tratado se retiene de manera estable a un potencial negativo durante un período prolongado. Por consiguiente, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención se puede usar para preparar una composición cosmética. Además de la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier otro componente cosmético generalmente utilizable para la composición cosmética, y los componentes cosméticos se pueden seleccionar de las siguientes sustancias de acuerdo con la eficacia y el efecto. Los ejemplos de estos incluyen excipientes, fragancias y similares que se usan generalmente para cosméticos, así como diversos componentes cosméticos tales como grasas y aceites grasos, tensioactivos, humectantes, agentes blanqueadores, agentes de ajuste de pH, aglutinantes, alcoholes polivalentes, aceites esenciales, fragancias, espesantes, conservantes, antioxidantes, absorbentes de ultravioletas, pigmentos, materiales de plantas pulverizadas, fármacos crudos, sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, detergentes, emulsionantes y similares.
- Más aún, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención se puede usar para alimentos para ganado, peces y similares, para mejorar los síntomas de la piel causados por oxígeno activo (humedad, sequedad, opacidad de color, manchas, pecas, flacidez, arrugas, textura de la piel, firmeza y similares), para la prevención o tratamiento de enfermedades tales como por ejemplo, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis, infarto de miocardio, reumatismo, inflamación, úlcera de estómago, catarata, cáncer, SIDA, y similares, para la prevención de envejecimiento, y para un restaurador de cabello.
- Más aún, debido a que el método mencionado anteriormente de la presente invención puede suprimir la reacción de Maillard durante el tratamiento, el producto tratado es menos coloreado, y se espera que se use para una gama más amplia de aplicaciones.
- La mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención se puede usar para preparar una composición mejoradora de resistencia a las enfermedades de plaga. Además en la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, la composición mejoradora de la resistencia a las enfermedades de las plantas se puede mezclar con componentes tales como solventes y tensioactivos solubles en agua, siempre que no se deteriore el efecto de mejorar la resistencia a enfermedades, plagas, y los nematodos logrados por la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención.
- Más aún, un material que contiene una o más sustancias que tienen actividades inductoras seleccionadas de péptidos, polisacáridos, glicoproteínas y lípidos también se puede añadir a la composición mejoradora de la resistencia a las enfermedades de las plantas. Varias sustancias específicas para plantas individuales se han conocido como las sustancias que tienen actividades inductoras, y las sustancias que tienen actividades inductoras se pueden seleccionar según sea apropiado de acuerdo con la planta que será sometida.
- Más aún, un agente de control de crecimiento de plantas también se puede añadir a la composición mejoradora de la resistencia a las enfermedades de las plantas.
- En general, los organismos son afectados por el potencial de oxidación-reducción de sus ambientes en crecimiento. Se puede decir que aquellos que prefieren ambientes con altos potenciales de oxidación-reducción son aeróbicos, mientras que aquellos que prefieren ambientes con potenciales de oxidación-reducción bajos son altamente anaeróbicos. Los metanógenos son bien conocidos como organismos que requieren estados anaeróbicos particularmente altos, y el potencial de oxidación-reducción de los medios de cultivo para metanógenos debe ser de -330 mV o menos. Además, las bacterias nitrificantes ordinarias, bacterias desnitrificantes, bacterias reductoras de sulfato y similares requieren bajos potenciales de oxidación-reducción. Los ejemplos de organismos que prefieren ambientes aeróbicos incluyen, casi todos los animales, casi todos los hongos, algunas bacterias tales como bacterias del género *Bacillus*, el género *Pseudomonas* y similares, nematodos y similares. Como se describió anteriormente, los microorganismos individuales tienen sus respectivas regiones preferidas de potencial de oxidación-reducción. Al

- controlar el potencial de oxidación-reducción, los microorganismos específicos se pueden ser activar o inactivar. Cuando se crea un ambiente con un bajo potencial de oxidación-reducción mediante el uso de la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, se pueden suprimir las actividades de microorganismos que prefieren ambientes aeróbicos. Por lo tanto, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos se puede usar como un fungicida, un agente antiviral o similares. De la misma manera, los microorganismos que prefieren ambientes anaeróbicos pueden ser activados. Por lo tanto, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención se puede usar para el cultivo de bacterias de ácido láctico, metanógenos y similares; elaboración de bebidas alcohólicas por fermentación anaeróbica, tal como la elaboración de cerveza; producción de bebidas de bacterias de ácido láctico; y similares.
- 10 Cuando se usa para la mejora de los síntomas de la piel, la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención se puede preparar, por ejemplo, en forma de un suplemento. Se puede emplear un método conocido para la preparación. La forma de dosis no está particularmente limitada, y los ejemplos de esta incluyen preparaciones orales que incluyen preparaciones sólidas tales como un comprimido, un polvo, gránulos finos, gránulos, una cápsula y una píldora; y preparaciones líquidas tales como una solución acuosa, una suspensión, un jarabe y una emulsión; y similares. Estas preparaciones orales pueden ser producidas por un método generalmente empleado. En la presente, cualquiera de los excipientes, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, alcoholes, agua, polímeros solubles en agua, edulcorantes, correctores, acidulantes, portadores de fármacos, y similares, que se usan generalmente en la técnica, se puede añadir a las preparaciones orales de acuerdo con las formas de estas.
- 15 Más aún, se puede producir una bebida para la mejora del síntoma de la piel mediante la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención con una bebida. Los ejemplos de la bebida incluyen jugos de frutas, jugos de verduras, té de cebada tostado, té verde, té negro, café, bebidas de yogur, bebidas de bacterias de ácido láctico, bebidas poco alcohólicas y similares. Al beber la bebida con la que se combine la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, los síntomas de la piel descriptos anteriormente se previenen o mejoran en forma segura.
- 20 Además, se puede producir un alimento para la mejora del síntoma de la piel mediante la combinación de la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención con un alimento. Los ejemplos del alimento incluyen productos lácteos tales como leche fermentada, queso y manteca; productos de confitería tales como caramelos, galletitas, goma de mascar, torta de mantequilla; panes; y similares. Tomando el alimento con el que se mezcla la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, los síntomas de la piel descriptos anteriormente se evitan o mejoran en forma segura.
- 25 Más aún, se puede producir un cosmético para la piel. Los ejemplos del cosmético para la piel incluyen loción, emulsión, crema cosmética, base, colorete, polvos faciales, y similares. El cosmético para la piel se puede preparar de acuerdo con un método ordinario. Mediante el uso de un cosmético para la piel con el que se combina la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, se previenen o mejoran los síntomas de la piel descriptos anteriormente.
- 30 Más aún, se puede producir un cosmético para la piel mediante la combinación de la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos del cosmético para la piel incluyen loción, emulsión, crema cosmética, base, colorete, polvo facial, y similares. El cosmético para la piel se puede preparar de acuerdo con un método ordinario. Mediante el uso del cosmético para la piel con el que se combina la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención, se previenen o mejoran los síntomas de la piel descriptos anteriormente.
- 35 Además, se puede producir una preparación farmacéutica para la mejora de los síntomas de la piel que contiene la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención como ingrediente activo. La forma de dosis de la preparación farmacéutica para la mejora de los síntomas de la piel de la presente invención no está particularmente limitada, y su ejemplo incluye preparaciones orales que incluyen preparaciones sólidas tales como un comprimido, un polvo, gránulos finos, gránulos, una cápsula, una píldora y similares; preparaciones líquidas tales como una solución acuosa, una suspensión, un jarabe y una emulsión; y similares. Estas preparaciones orales pueden ser producidas por un método generalmente empleado. En la presente, cualquiera de los excipientes, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, alcoholes, agua, polímeros solubles en agua, edulcorantes, correctores, acidulantes, portadores de fármacos, y similares, que se usan generalmente en la técnica, se pueden añadir a las preparaciones orales de acuerdo con sus formas. Tomando la preparación farmacéutica para la mejora de los síntomas de la piel que contiene la mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos obtenida de acuerdo con la presente invención como ingrediente activo, se previenen o mejoran los síntomas de la piel descriptos anteriormente.
- 40
- 45
- 50
- 55

### Ejemplos

(Ejemplo 1: Producción de la mezcla reductora obtenida a partir de la levadura de cerveza en ausencia de Oxígeno)

Después de la operación de calentamiento, se introdujeron 500 L de agua auxiliar en un sistema de conversión de

materiales multipropósito (equipo obtenido por Rumoi Biomass Center). Cuando la temperatura en una porción inferior alcanzó 67 °C, se introdujeron 500 kg de levadura de cerveza seca (nitrógeno: 8%). Estos se mezclaron entre sí durante 10 minutos; y luego se inició la introducción de vapor sobrecalentado. El oxígeno disuelto se redujo mediante la realización de una operación de desaireación de tal manera que se introdujo vapor sobrecalentado en un espacio superior, mientras que la temperatura de agua se dejó elevar y se abrió una válvula de escape superior. Las Figs. 1 y 2 muestran cambios de nieve con el tiempo de la temperatura y la presión en el reactor debido al vapor sobrecalentado. Después del tratamiento en condiciones de una presión de 1,6 MPa o más y una temperatura de 180 °C durante 10 minutos, se obtuvieron 1,13 t de una mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza (líquido, nitrógeno: 3%). El potencial de oxidación-reducción de la mezcla fue de -110 a -160 mV.

10 (Ejemplo 2: Prueba para investigar el efecto sobre la resistencia a enfermedades de plantas)

Se realizó una prueba para investigar un efecto del producto de tratamiento hidrotérmico derivado de levadura sobre la resistencia a enfermedades de plantas. Se preparó una muestra líquida que contenía 250 ppm de la mezcla reductora obtenida a partir de levadura obtenida en el Ejemplo 1, 10 µg/ml de Rifamicina, y 500 µg/ml de ampicilina. Se usó el agua como control.

15 La resistencia a la enfermedad se evaluó mediante un método de evaluación de la actividad inductora basado en el método de Yoshikawa, M., et al. (Nature 275, 546-547 (1978)). La actividad inductora es una acción para inducir la síntesis de una sustancia antimicrobiana tal como una fitoalexina en el cuerpo de una planta. Específicamente, se sembraron sojas (Glycine, max cv. Green Homer) en un suelo de cultivo obtenido mediante la mezcla de vermiculita y suelo de humus, y luego se cultivaron bajo luz fluorescente durante 10 a 14 días bajo condiciones de luz de 16 horas, una condición de 8 horas de oscuridad y 25 °C. Después de eso, se cortaron los cotiledones, y sus superficies traseras se eliminaron con una rasuradora, y se dejaron caer 80 µl de la muestra líquida descrita anteriormente sobre cada cotiledón. Los cotiledones se mantuvieron quietos durante 24 horas a 25 °C bajo una condición de luz y se determinó la lesión estaba enrojecida. Una lesión que se enrojeció indica que se indujo la síntesis de la gliceolina, que es una fitoalexina de la soja. Los resultados de la determinación se muestran en la Tabla 1. La Fig. 3 muestra una fotografía utilizada para la determinación (en la fotografía de la Fig. 3, las lesiones que se enrojecieron se reconocieron como porciones negras).

Como se describió anteriormente, se halló que la mezcla reductora obtenida a partir de levadura que se sometió al tratamiento hidrotérmico tuvo un efecto de mejora de la resistencia a enfermedades de una planta.

Tabla 1

Muestra	Determinación de actividad
Grupo control (agua)	-
Grupo de prueba (se usó la mezcla del Ejemplo 1)	+

30

(Ejemplo 3: Producción de fertilizante usando la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza)

La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza del Ejemplo 1 (líquido, nitrógeno: 3% en p/p), como estaba, se usó como un ingrediente activo líquido. A 500 L de una solución de urea al 12% p/p, se añadieron 250 L del ingrediente activo líquido, y los materiales se mezclaron entre sí, y se dejaron reposar durante 10 días. Por lo tanto, se produjo un material fertilizante líquido. La Fig. 4 muestra el cambio con el tiempo en el potencial de oxidación-reducción del material fertilizante líquido. Cabe señalar que, el potencial de oxidación-reducción en el Día 0 es el de la solución de urea 12%. Como es evidente a partir de la Fig. 4, el material fertilizante líquido mantuvo la capacidad reductora incluso después de que habían transcurrido 10 días, y el potencial de oxidación-reducción fue de -173 mV después de que habían transcurrido 10 días.

35

40 A 1000 L del material fertilizante líquido, se añadieron 350 kg de un mineral silíceo en polvo (nombre comercial: North Keido, distribuidor: Hokkaido Natural Ltd.). Los materiales se mezclaron entre sí y se secaron durante tres semanas bajo la condición de un flujo de aire. Por lo tanto, se produjo un material de fertilización en polvo con un contenido de agua del 35%.

(Ejemplo 4: Tratamiento de inundación en el suelo de campo de granja por uso de material fertilizante en polvo)

45 Se utilizó un suelo arenoso con una conductividad eléctrica EC de 1,7 m/S. Con 40 L de suelo arenoso, se mezclaron 10 L del material fertilizante en polvo del Ejemplo 3. La mezcla se colocó en un recipiente bien cerrado y en forma de caja. Como grupos de control, el polvo de mineral silíceo se usó en una cantidad igual a la cantidad de polvo mineral silíceo contenido en 10 L del material fertilizante en polvo, y el material fertilizante líquido se usó en una cantidad igual a la cantidad del material fertilizante líquido contenido en 10 L del material fertilizante en polvo, en lugar del material de fertilizante en polvo. Cada mezcla se colocó en un estado de inundación y se dejó en reposo durante 15 días a temperatura normal. El cambio en el potencial de oxidación-reducción se midió durante 15 días. La Fig. 5 muestra los

50

resultados.

(Ejemplo comparativo 1: Producción de la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza en presencia de oxígeno)

5 En un reactor de alta presión que tiene una capacidad de 1 l, se introdujeron 500 g de una solución que contiene un 5% en masa de paredes celulares de levadura de cerveza seca, y se calentaron a 195 °C con agitación. Cuando la temperatura alcanzó los 195 °C, la presión dentro del contenedor fue de 1,4 MPa. Luego, la reacción se dejó avanzar durante 5 minutos bajo las condiciones. El material tratado inmediatamente después de su obtención tenía un potencial de oxidación-reducción de -200 mV. La cromaticidad del material tratado se midió con un colorímetro en un modo ASCE (componente especular excluido). Como resultado, L = 28,68; a = -0,45; y b = 0,96.

10 (Ejemplo 5: Producción de mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza en ausencia de Oxígeno)

15 En un reactor de alta presión con una capacidad de 1 L, se introdujeron 500 g de una solución que contiene un 5% en masa de paredes celulares de levadura de cerveza seca. El aire dentro del reactor se reemplazó con nitrógeno, y luego la solución se calentó a 195 °C con agitación. Cuando la temperatura alcanzó los 195 °C, la presión dentro del contenedor fue de 1,4 MPa. Luego, la reacción se dejó avanzar durante 5 minutos bajo las condiciones. El material tratado inmediatamente después de su obtención tenía un potencial de oxidación-reducción de -226 mV. Los resultados medidos con el colorímetro fueron los siguientes: L = 38,65; a=4,79; y b=10,91. La comparación se realiza entre los resultados del Ejemplo comparativo 1 y los resultados del Ejemplo 5 en la siguiente Tabla 2. Como se evidencia a partir de la Tabla 2, el potencial de oxidación-reducción fue más bajo en el Ejemplo 5 que en el Ejemplo comparativo 1. Más aún, sobre la base de los valores L, el material tratado del Ejemplo 5 tuvo un color más claro que el del Ejemplo comparativo 1.

Tabla 2

	Potencial de oxidación-reducción	Colorímetro		
		Valor L	Valor a	Valor b
Ejemplo comparativo 1	-200 mV	28,68	-0,45	0,96
Ejemplo 5	-226 mV	38,65	4,79	10,91

25 Cabe señalar que el potencial de oxidación-reducción generalmente se reduce por la reacción de Maillard. En el Ejemplo comparativo 1, el potencial de oxidación-reducción se redujo al provocar la reacción de Maillard (= cambio a un color oscuro). Por el contrario, el potencial de oxidación-reducción en el Ejemplo 5 se redujo sin producir la reacción de Maillard (= color claro restante). Es fácil reducir un potencial de oxidación-reducción mediante la aplicación calor para producir la reacción de Maillard. La presente invención es diferente de las tecnologías convencionales porque el potencial de oxidación-reducción se reduce sin producir la reacción de Maillard.

30 (Ejemplo 6: Porcentaje de inhibición de radicales DPPH de la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza)

35 La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza obtenida en el Ejemplo 1 se sometió a una medición para la actividad de extinción del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). El método de medición fue el siguiente. La sustancia de prueba se suspendió en agua, y la suspensión se transfirió a una placa de 96 pocillos donde se prepararon series de dilución (100 µl por pocillo). A cada pocillo, se añadieron 100 µl de una solución DPPH 750 µM (disuelta en metanol 100%). La placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se midió la absorbancia a 550 nm. El porcentaje de inhibición se calculó a partir de la absorbancia de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = (A-B)/(C-D) \times 100$$

A: solución de muestra + enzima, B: solución de muestra + sin enzima, C: agua + enzima, D: agua + no enzima

40 La Fig. 6 muestra los resultados. Más aún, se determinó una concentración final de la sustancia de prueba a la que se redujo la absorbancia 50% (IC50), y esto se empleó como un índice de la intensidad de la actividad. Como comparación, se usaron levadura de cerveza seca y una levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura. La levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura se obtuvo tratando una levadura de cerveza seca en condiciones presurizadas de 2 atm (0,2 MPa) a 121 °C durante 25 minutos. La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza tenía una IC50 de 2463 ppm, y la levadura de cerveza seca tenía una IC50 de 18704 ppm. La levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura tenía una actividad tan extremadamente débil que fue imposible calcular su IC50. La mezcla reductora obtenida a partir de la levadura de cerveza exhibió una actividad notablemente más fuerte que la levadura de cerveza seca y la levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura. Estos resultados mostraron que la mezcla reductora obtenida a partir del

material obtenido por tratamiento de la levadura de cerveza tenía una alta capacidad antioxidante, y que la presente invención mejoró la capacidad antioxidante de la levadura de cerveza seca.

(Ejemplo 7: Porcentaje de inhibición de SOD de la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza)

5 La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza obtenida en el Ejemplo 1 La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza obtenida en el Ejemplo 1 se sometió a una medición de actividad de SOD (superóxido dismutasa). La medición se realizó usando el kit de ensayo SOD-WST de Dojindo Laboratories de acuerdo con el protocolo estándar. Específicamente, las muestras diluidas se introdujeron en una placa de 96 pocillos (20 µl por pocillo). Luego, se añadieron 200 µl de una solución de WST (sal de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) y 20 µl de una solución de xantina oxidasa a cada uno de los pocillos. La placa se dejó reposar a 37 °C  
10 durante 20 minutos. Después de eso, se midió la absorbancia a 460 nm. El porcentaje de inhibición se calculó a partir de la absorbancia de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = (A-B)/(C-D) \times 100$$

A: solución de muestra + enzima, B: solución de muestra + no enzima, C: agua + enzima, D: agua + no enzima

15 La Fig. 7 muestra los resultados. Se determinó una concentración final de la sustancia de prueba en la que se redujo la actividad a 50% (IC50), y esto se empleó como un índice de la intensidad de la actividad. Como comparación, se usaron levadura de cerveza seca y una levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura como las del Ejemplo 6. La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza exhibió una actividad notablemente más fuerte que la levadura de cerveza seca y la levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura. La mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza tuvo una IC50 de 2445 ppm, y la levadura de cerveza seca  
20 tuvo una IC50 de 20619 ppm. Levadura de cerveza seca tratada a alta presión y alta temperatura tenía una actividad débil por lo que fue imposible calcular su IC50. Estos resultados mostraron que la mezcla reductora obtenida a partir de levadura de cerveza tenía alta capacidad antioxidante, y que la presente invención mejoró la capacidad antioxidante de levadura de cerveza seca.

(Ejemplo 8: Tratamiento de vapor sobrecalentado en presencia de mineral silíceo)

25 Se realizó una prueba para evaluar el efecto de un catalizador durante un tratamiento de vapor sobrecalentado. Las células de levadura de cerveza seca en polvo se disolvieron en agua al 25% p/p. Para un experimento de prueba, se añadió un mineral silíceo (diatomita) al 16% p/p como catalizador, mientras que no se añadió catalizador para un experimento de control.

30 Se llevó a cabo un tratamiento con vapor sobrecalentado de la misma manera que en el Ejemplo 1. Cuando la temperatura alcanzó 160 °C, la presión dentro del recipiente fue de 1,86 MPa. Luego, la reacción se dejó avanzar durante 10 minutos bajo las condiciones.

35 Los colores de los materiales tratados se observaron visualmente. El color del material tratado del experimento de control fue más profundo que el del líquido de levadura antes el tratamiento. La cromaticidad del material tratado del experimento de prueba fue casi la misma que la del líquido de levadura de materia prima antes del tratamiento. Esto sugirió que el mineral silíceo añadido como catalizador suprimió aún más la reacción de Maillard.

40 A continuación, se midió el color de los materiales tratados. Cada uno de los materiales tratados se mezcló bien, y se muestrearon 40 ml de estas y se colocaron en un vaso de precipitado con una capacidad de 100 ml. Cada una de las muestras se fotografió con una cámara digital, y se midió una imagen impresa de esta con un aparato de medición de laboratorio (Konica Minolta Sensing, Inc., un espectrofotómetro CM-2600d) en un modo SCE (componente especular excluido). La Tabla 3 muestra los resultados. Cada uno de los materiales tratados se diluyó con agua para alcanzar una concentración celular de 10% p/p, y se midió el cambio en el potencial de oxidación-reducción (Fig. 8). Los aumentos en el potencial de oxidación-reducción de las mezclas reductoras derivadas de levadura de cerveza seca 14 días después de la preparación de dicha mezcla fueron 3,5% del potencial más bajo en el caso del experimento de prueba, y 26,3% en el caso del experimento de control.

45 Tabla 3 Cromaticidad del material tratado sometido al tratamiento de vapor sobrecalentado en presencia de mineral silíceo

	Colorímetro		
	Valor L	valor a	valor b
Experimento de prueba	57,88	2,49	25,09
Experimento control	35,31	3,64	6,32

(Ejemplo 9: Tratamiento de vapor sobrecalentado en microorganismo anaeróbicos y en mohos de Koji (*Aspergillus*) y levadura Shochu (bebida destilada japonesa))

Un lodo digerido anaeróticamente que contiene principalmente microorganismos anaeróbicos (un lodo que se obtuvo de una planta de tratamiento de excrementos humanos y se deshidrata con una prensa de tornillo hasta un contenido de agua del 48 a 52% en p/p) y un depósito de Shochu que contiene principalmente mohos de Koji y levadura Shochu (que tiene un contenido de agua de 43 a 45 p/p) se sometieron a un tratamiento de vapor sobrecalentado de la misma manera que en el Ejemplo 1. Cabe señalar, sin embargo, que la temperatura de tratamiento fue de 185 °C a 190 °C, y el tiempo de tratamiento fue de 20 minutos. Se separó un líquido de cada uno de los materiales tratados mediante centrifugación. El líquido tratado se diluyó 10 veces con agua, y se midió el potencial de oxidación-reducción durante 14 días. La Fig. 9 muestra los resultados. El aumento del potencial de oxidación-reducción de la mezcla reductora obtenida a partir de los microorganismos anaeróbicos 14 días después de la preparación de dicha mezcla fue 35,3% del potencial más bajo. Mientras tanto, el aumento del potencial de oxidación-reducción de la mezcla reductora obtenida a partir de los mohos de Koji y la levadura Shochu 14 días después de la preparación de dicha mezcla fue 22,2% del potencial más bajo.

(Ejemplo comparativo 2)

Las paredes celulares de levadura (un residuo que queda después de que se produjo un extracto de levadura) se diluyeron con agua purificada a 3% en masa y a 5% en masa. En un recipiente de acero inoxidable resistente a la presión con una capacidad de 100 ml, se cargaron 50 ml del líquido de pared celular de levadura diluida y se calentaron en un dispositivo termostático. Las condiciones de tratamiento térmico fueron 205 °C y 30 minutos. Después del tratamiento, el recipiente se dejó enfriar en forma natural durante dos horas en un estado herméticamente cerrado, luego se abrió, y se midió el potencial de oxidación-reducción del material tratado. Como es evidente a partir del gráfico mostrado en la Fig. 10, los potenciales de oxidación-reducción de los materiales tratados fueron de -142 mV a -188 mV inmediatamente después del tratamiento, y aumentaron a 0 mV o más en un día. Como se describió anteriormente, el potencial de oxidación-reducción del material tratado obtenido de acuerdo con la presente invención fue estable después de que el potencial de oxidación-reducción llegó a 0 mV o menos después del tratamiento. En contraste, el potencial de oxidación-reducción de cada uno de los materiales tratados del Ejemplo comparativo 2 se elevó inmediatamente, y alcanzó 0 mV o más en un día.

Tabla 4 Potencial de oxidación-reducción de los materiales tratados

	Inmediatamente después del tratamiento	Después de un día
3% de paredes celulares de levadura diluidas	-142	58
5% de paredes celulares de levadura	-188	19

(Ejemplo 10: Producción de material en polvo con el cual se combinó la mezcla reductora obtenida a partir de pared celular de levadura de cerveza)

A 100 L de la mezcla reductora obtenida a partir de la pared celular de levadura de cerveza obtenida en el Ejemplo 1, se añadieron 600 kg de un polvo de mineral silíceo (nombre comercial: North Keido, distribuidor: Hokkaido Natural Ltd.). Los materiales se mezclaron entre sí y se secaron durante tres semanas bajo la condición de un flujo de aire. Por lo tanto, se produjo un material en polvo, que tiene un contenido de agua de 35%.

(Ejemplo 11: Tratamiento de inundación en campo agrícola con material en polvo)

Mediante el uso de un campo agrícola (Biratori cho, Hokkaido) para la producción real de tomate, se mezclaron 100 kg del material en polvo del Ejemplo 10 por 10 a de campo agrícola. El campo agrícola se inundó suficientemente y se cubrió con una lámina de plástico. Para el control, se mezclaron 2.000 kg de salvado de trigo, que se usa generalmente para la esterilización por reducción de inundaciones, por cada 10 a de campo agrícola en lugar del material en polvo. El campo agrícola se inundó suficientemente y se cubrió con una lámina de plástico. El tratamiento de inundación se realizó del 7 de mayo de 2009 al 6 de junio de 2009. La siembra se realizó el 18 de junio. Los suelos ubicados a una profundidad de 20 cm se muestrearon en cada uno de los días 14 de mayo, 25 de mayo y 6 de junio y se midió el potencial de oxidación-reducción de una solución obtenida mediante la dilución del suelo muestreado 10 veces con agua de la canilla. Además, el suelo ubicado a una profundidad de 20 cm se muestreó en cada uno de los días 25 de mayo, 18 de junio, 18 de julio y 18 de agosto, y se midió la cantidad (células/g de suelo seco) de las bacterias *Fusarium*, que son bacterias patógenas del suelo. Las tablas 5 y 6 muestran los resultados. Aquí el área no tratada fue un área donde solo se realizó el tratamiento de inundación sin la introducción del material. El potencial de oxidación-reducción del área de prueba fue menor que el del área no tratada. Además, el efecto de esterilización sobre la bacteria *Fusarium* después de la esterilización por reducción de inundación del área de prueba fue alto, y estaba en el mismo nivel que el del área de salvado de trigo. La proliferación de la bacteria *Fusarium* después de la plantación

fue más suprimida en el área de prueba que en el área no tratada y el área de salvado de trigo.

Tabla 5 Cambio en el Potencial de oxidación-reducción (mV)

	14 de mayo	25 de mayo	6 de junio
Área no tratada	269	244	270
Área de salvado de trigo	-98	-160	86
Área de prueba	-92	-149	51

Tabla 6 Cambio en la cantidad de bacterias Fusarium (células/g de suelo seco)

	Antes del tratamiento	25 de mayo	18 de junio	18 de julio	18 de agosto
Área no tratada	$2,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	$9,7 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$
Área de salvado de trigo	$7,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^2$	3	$4,9 \times 10^2$	$9,8 \times 10^2$
Área de prueba	$2,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^2$	1	$3,6 \times 10$	$5,1 \times 10$

5

(Ejemplo 12: Tratamiento de inundación en el campo agrícola con material en polvo)

Los nematodos aislados de un campo agrícola (prefectura de Chiba) para producir realmente tomate se cultivaron en un medio de agar, y luego el gel se cortó y se transfirió a una placa de Petri. El gel se sumergió en una solución acuosa 5% del material en polvo del Ejemplo 10 para lograr un estado de inundación. Para un grupo no tratado para el control, el gel se sumergió en agua destilada para lograr un estado de inundación. Diez días más tarde, se observaron 25 nematodos en cada uno de los grupos de prueba y no tratados con un microscopio, se evaluaron su movilidad y se clasificaron en los siguientes cinco grados: 0 (los nematodos no se movieron del todo) a 4 (los nematodos se movieron vigorosamente).

10

0: Los nematodos no se movieron en absoluto.

15

1: Solo las porciones finales de los nematodos se movieron ligeramente.

2: Los cuerpos enteros de los nematodos se movieron ligeramente.

3: Los cuerpos enteros de los nematodos se movieron sin cambio de ubicación.

4: Los nematodos se movieron vigorosamente con el cambio de ubicación.

20

La Fig. 11 muestra los resultados. En contraste con el grupo no tratado, la actividad de los nematodos en el grupo de prueba se suprimió fuertemente.

(Ejemplo 13: Efecto de promoción en *Molokheiya*)

Mediante el uso de un campo agrícola (ciudad de Moriya, prefectura de Ibaraki) para la producción real de *Molokheiya*, se mezclaron 1000 kg del material en polvo del Ejemplo 11 por cada 10 a del campo agrícola. *Molokheiya* se sembró el 17 de junio de 2009 y se cosechó el 3 de agosto de 2009. Se midió el peso de la parte comestible. La Fig. 12 muestra los resultados. El rendimiento en el área de prueba fue mayor en aproximadamente el 74% que en el área no tratada.

25

(Ejemplo 14: Efecto de promoción del Garland Chrysanthemum)

Mediante el uso de un campo agrícola (ciudad de Moriya, prefectura de Ibaraki) para la producción real de Garland chrysanthemum, se mezclaron 1000 kg del material en polvo del Ejemplo 11 por cada 10 a del campo agrícola. Garland chrysanthemum se sembró el 17 de junio de 2009 y se cosechó el 3 de agosto de 2009. Se midió el peso de la parte comestible. La Fig. 13 muestra los resultados. El rendimiento en el área de prueba fue mayor en aproximadamente el 70% que en el área no tratada.

30

(Ejemplo 15: Acción bacteriostática sobre *Staphylococcus aureus*)

El material en polvo del Ejemplo 11 se añadió a un medio de cultivo (0,08% de caldo nutriente y 0,05% de extracto

de levadura) al 20% (p/v). Dos días más tarde, se inoculó *Staphylococcus aureus* ( $4,1 \times 10^9$  células/ml) y se sometió a cultivo estático a 25 °C durante dos días. Luego, se determinó el número de células viables. La Tabla 7 muestra los resultados. Aumentó la cantidad de bacterias *Staphylococcus aureus* del experimento no tratado. Por el contrario, la proliferación de la bacteria *Staphylococcus aureus* se suprimió en el experimento de prueba, y la cantidad de bacterias se redujo.

5

Tabla 7 Cambio en la cantidad de bacterias *Staphylococcus aureus* (células/ml)

	En la inoculación	Después del cultivo
Experimento no tratado (medio de cultivo)	$4,1 \times 10^9$	$6,4 \times 10^{10}$
Experimento de prueba	$4,1 \times 10^9$	$7,4 \times 10^6$

(Ejemplo 16: Acciones bacteriostáticas sobre *Staphylococcus chromogenes* y *Bacillus thuringiensis*)

10 El material en polvo del Ejemplo 11 se añadió a un medio de cultivo (0,08% de caldo nutriente y 0,05% de extracto de levadura) al 20% (p/v). Diez días más tarde, se inocularon *Staphylococcus chromogenes* ( $5,6 \times 10$  células/ml) y *Bacillus thuringiensis* ( $1,8 \times 10$  células/ml) que se aislaron de la leche de una vaca de inflamación mamaria, y se sometieron a cultivo estático a 25 °C durante dos días. Luego, se determinó el número total de células viables.

La Tabla 8 muestra los resultados. La cantidad de bacterias en el experimento no tratado se incrementó en gran medida, mientras que las bacterias no proliferaron en absoluto en el experimento de prueba.

15 Tabla 8 Cambio en la cantidad de bacterias de *Staphylococcus chromogenes* y *Bacillus thuringiensis* (células/ml)

	En la inoculación	Después del cultivo
Experimento no tratado (medio de cultivo)	$7,2 \times 10$	$3,5 \times 10^6$
Experimento de prueba	$7,2 \times 10$	0

(Ejemplo 17: Efecto de aumento del rendimiento sobre tomate cherry)

20 Se utilizó un campo agrícola (ciudad de Moriya, prefectura de Ibaraki) para la producción real de tomate cherry. El tomate Cherry se sembró el 4 de marzo de 2009 y se sembró el 6 de abril. Después de la siembra, el material líquido del Ejemplo 11 diluido 1000 veces se administró a través de un tubo de alimentación de agua una vez a la semana. El tomate cherry se cosechó del 25 de mayo al 5 de agosto y los rendimientos totales se compararon entre sí. La Fig. 14 muestra los resultados. El rendimiento en el área de prueba fue mayor en aproximadamente 12% que el del área no tratada.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para producir una mezcla reductora obtenida a partir de microorganismos que tiene un potencial de oxidación-reducción de 0 mV o menos, que comprende someter una levadura o un extracto de levadura a un tratamiento de vapor sobrecalentado en presencia de ácido silícico o un silicato donde el tratamiento de vapor sobrecalentado se realiza en ausencia de oxígeno y con un vapor sobrecalentado a una presión de 0,9 MPa a 1,9 MPa a 150°C a 210°C.
2. El método de producción según la reivindicación 1, en el que un extracto de levadura se somete al tratamiento de vapor sobrecalentado.
- 10 3. El método de producción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el componente de levadura o extracto de levadura es uno o una combinación de una pluralidad de miembros seleccionados del grupo que consiste en suspensiones de levadura de cerveza, levaduras de cerveza prensadas, levaduras de cerveza seca, suspensiones de levadura de cerveza, paredes celulares de levadura seca, suspensiones de pared celular de levadura y materiales inorgánicos que contienen levadura de cerveza.
- 15 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la mezcla reductora producida obtenida a partir de microorganismos se usa como una composición mejoradora de calidad del suelo.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la mezcla reductora producida obtenida a partir de microorganismos se usa como una composición mejoradora de la resistencia a las enfermedades de las plantas.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la mezcla reductora producida obtenida a partir de microorganismos se usa como una composición de promotor de crecimiento vegetal.

20

**FIG. 1**  
TEMPERATURA DENTRO DEL REACTOR DURANTE EL TRATAMIENTO

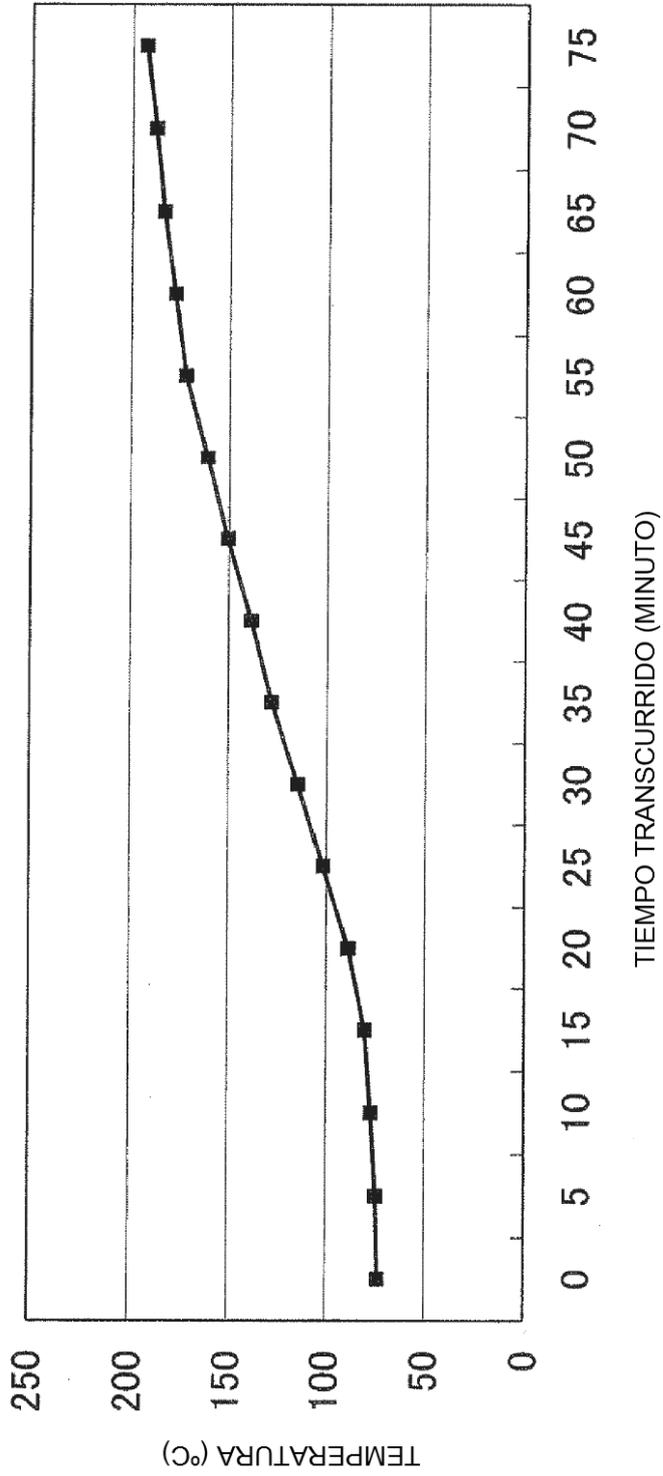


FIG. 2

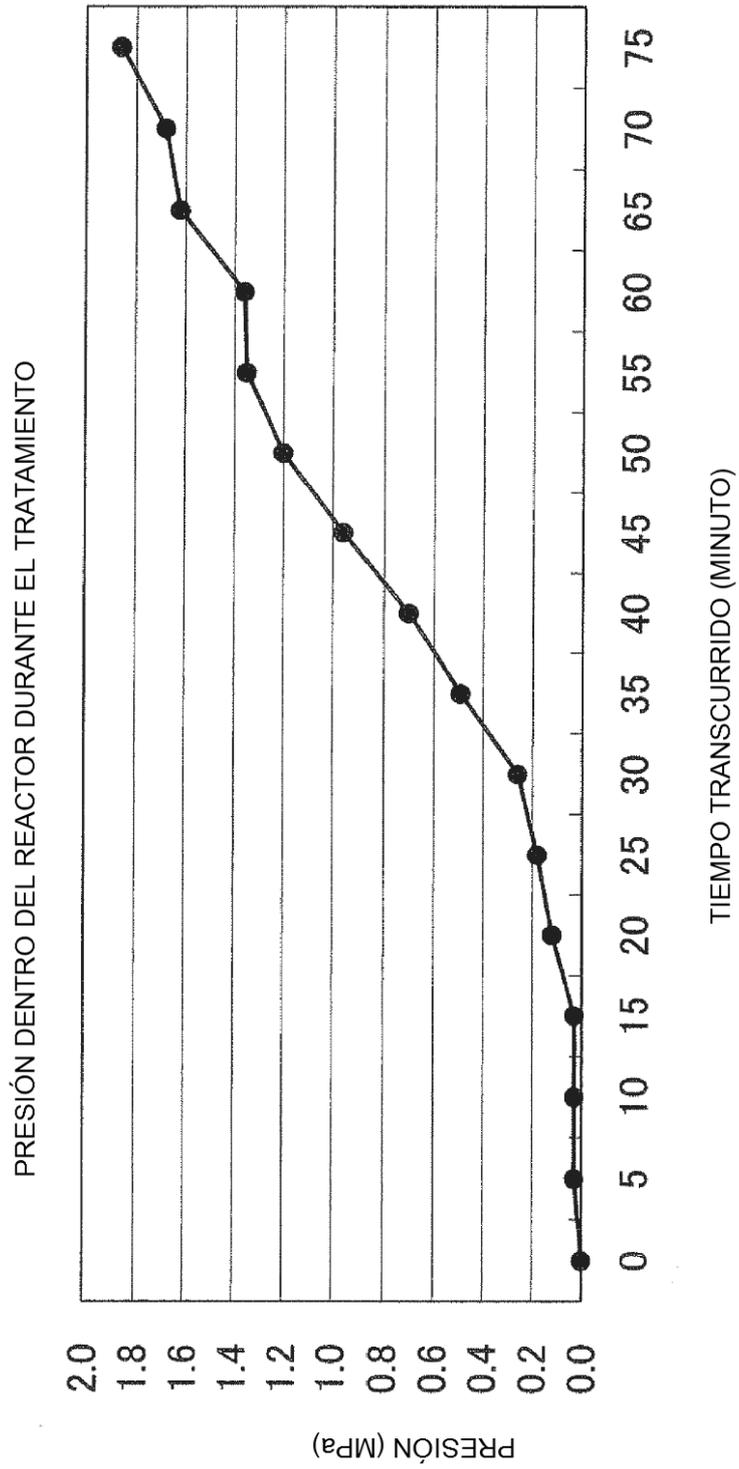


FIG. 3

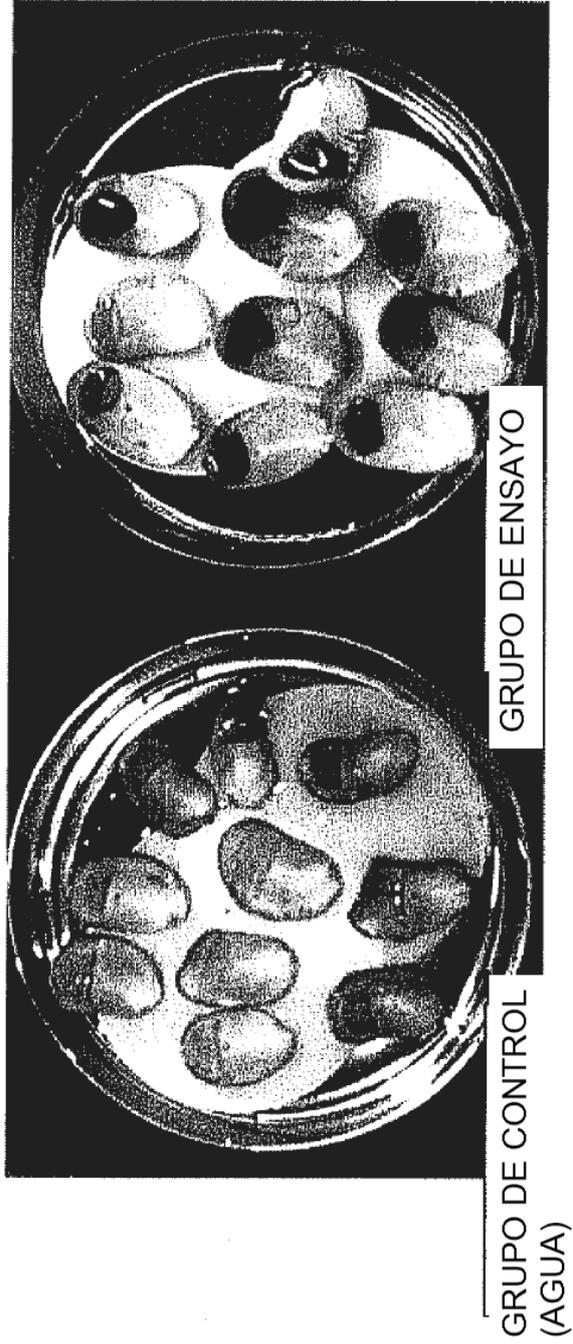


FIG. 4

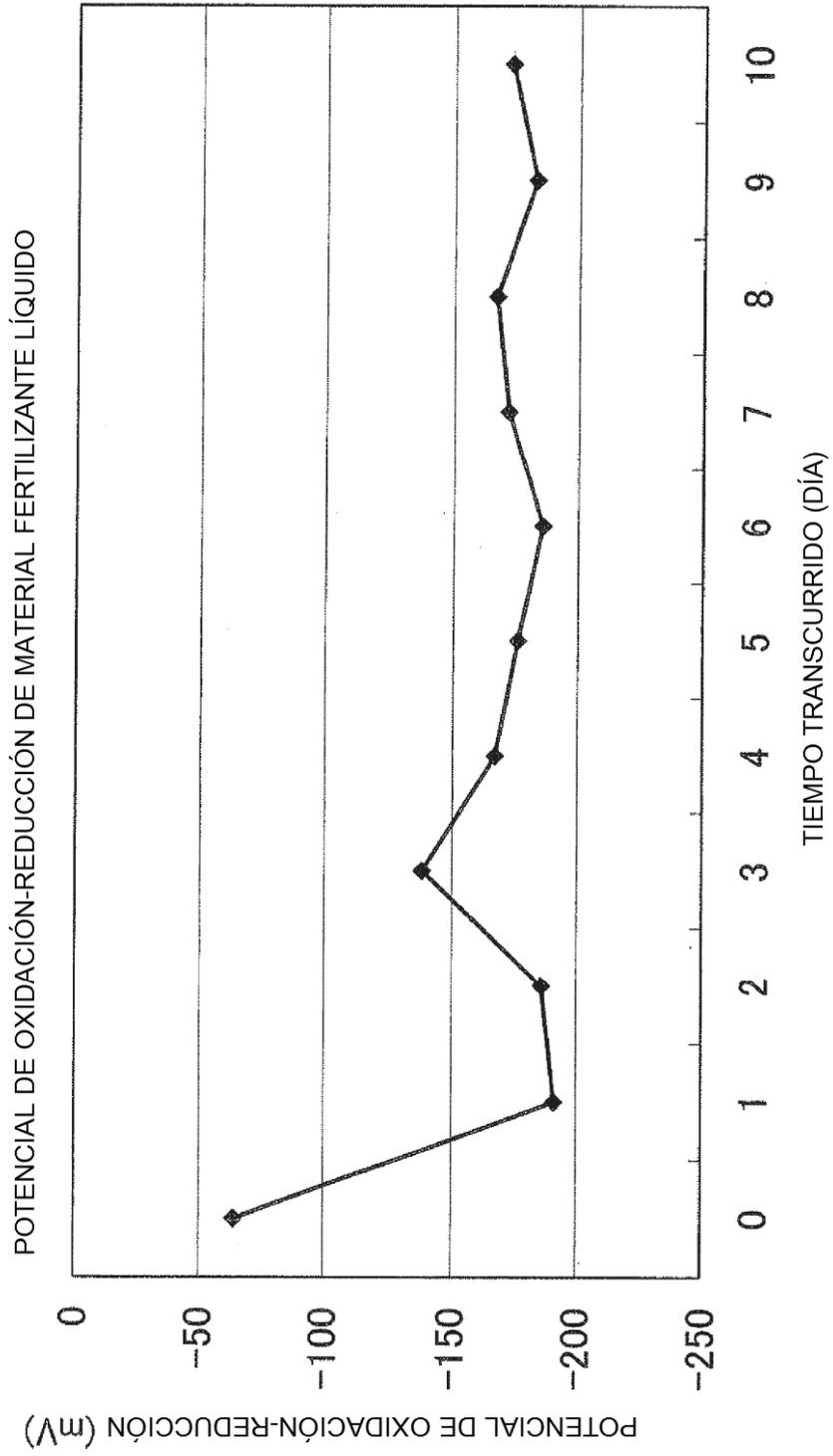


FIG. 5

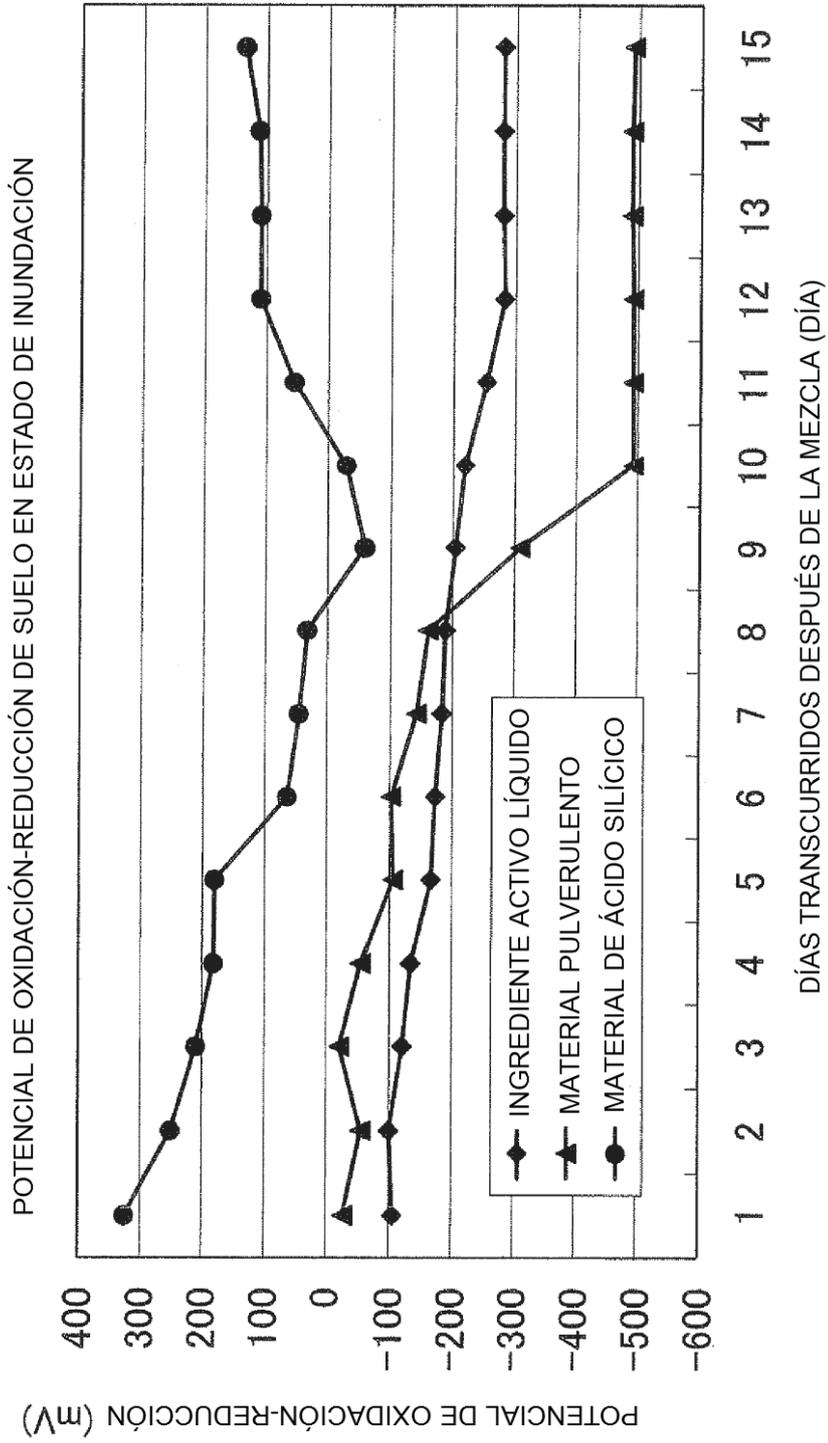


FIG. 6

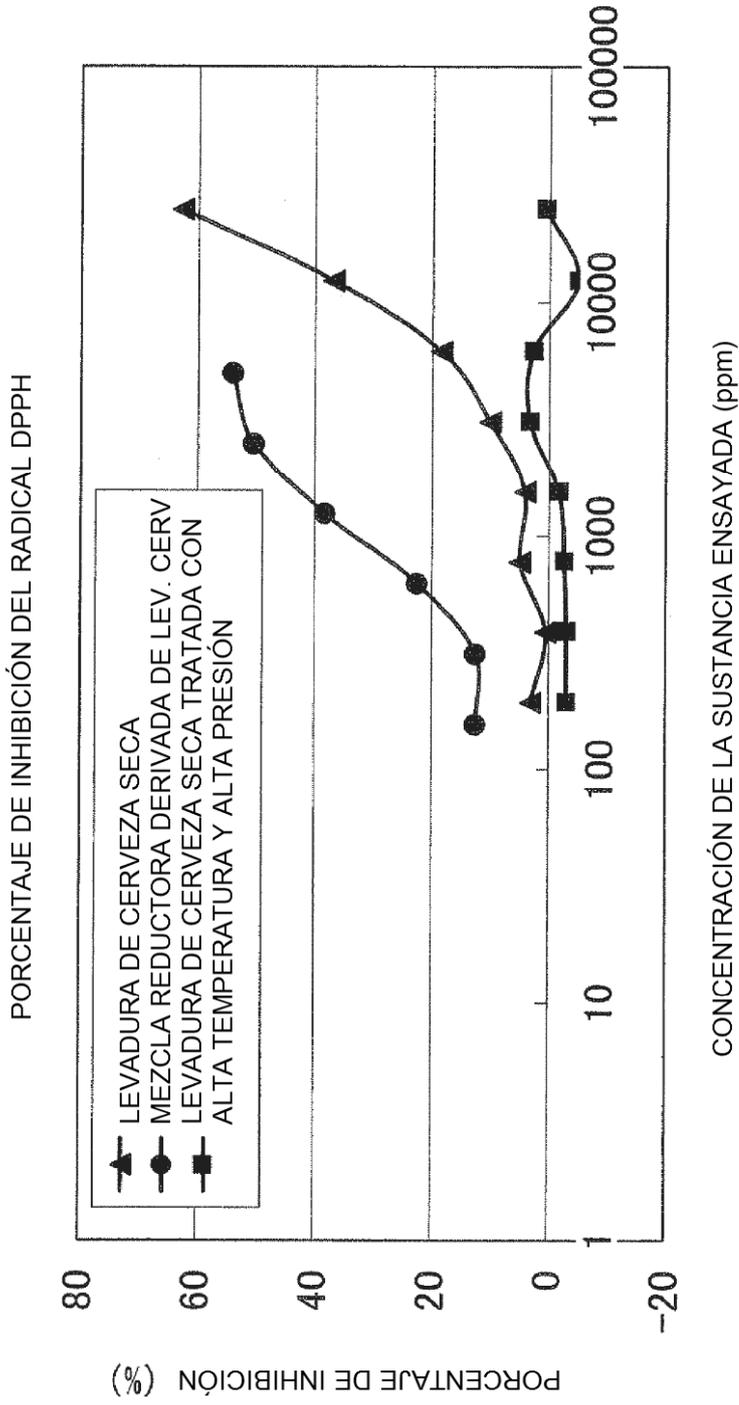




FIG. 8

POTENCIAL DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN DE MEZCLA REDUCTORA DERIVADA DE LEVADURA DE CERVEZA SOMETIDA A TRATAMIENTO CON VAPOR SUPERCALENTADO EN PRESENCIA DE ÁCIDO SILÍCICO

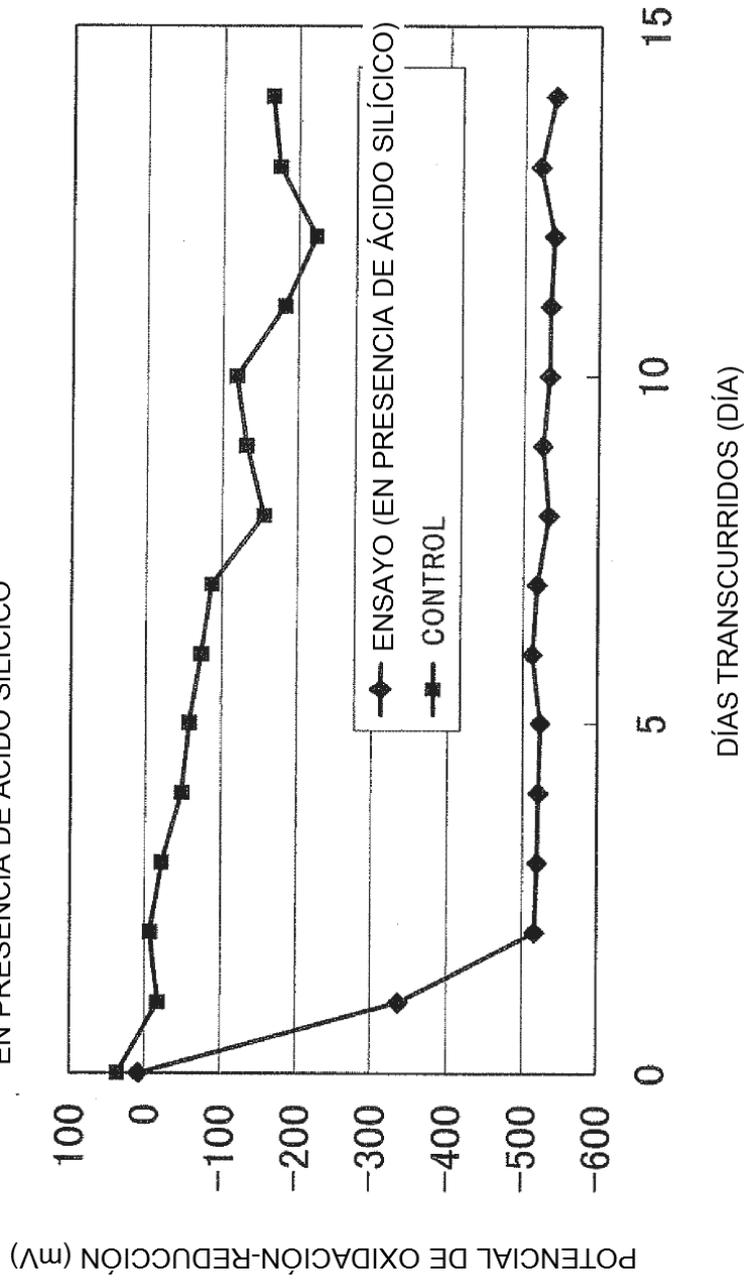
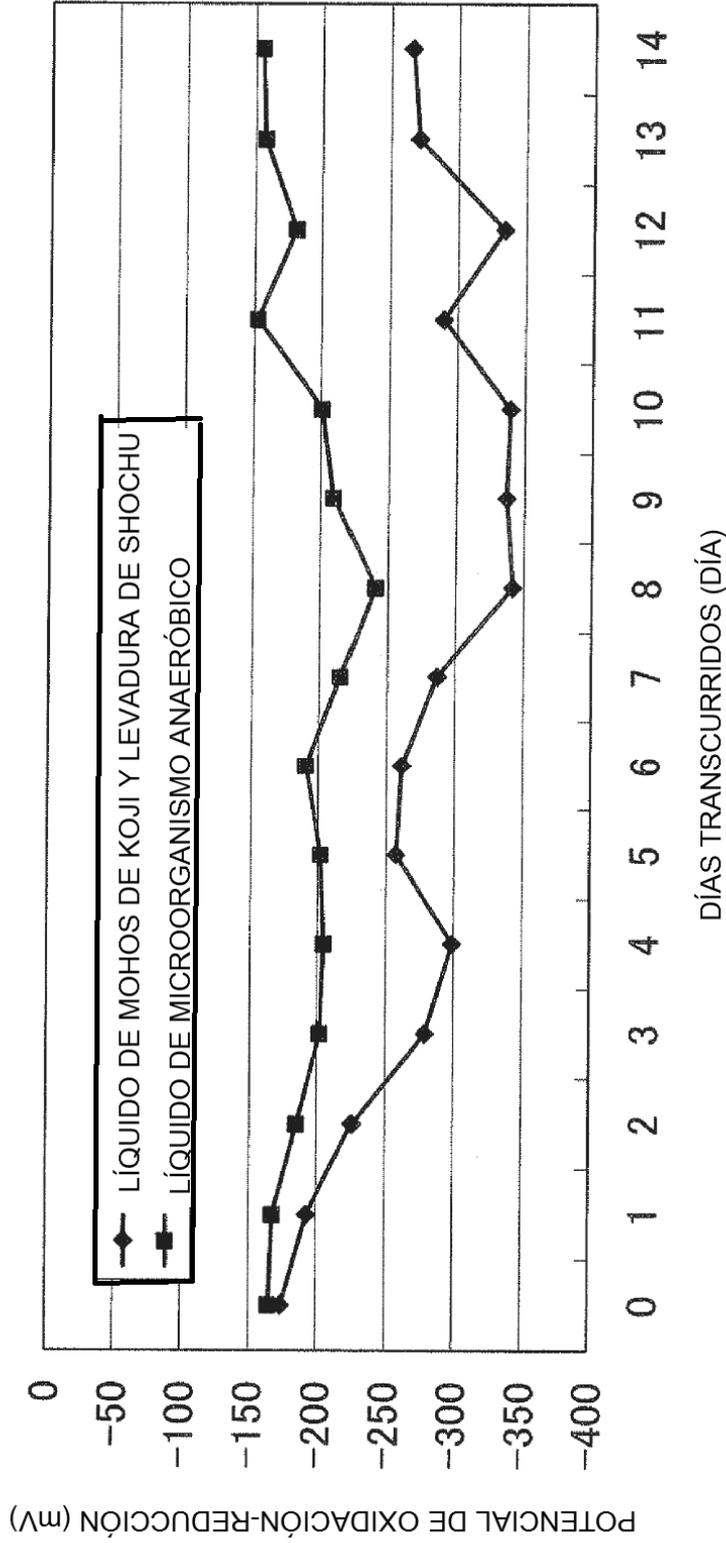


FIG. 9.

POTENCIAL DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN DE MEZCLA REDUCTORA DERIVADA DE MICROORGANISMOS ANAERÓBICOS Y MEZCLA REDUCTORA DERIVADA DE MOHOS DE KOJI Y LEVADURA DE SHOCHU



**FIG. 10**  
POTENCIAL DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN DE MATERIAL TRATADO  
DEL EJEMPLO COMPARATIVO 2

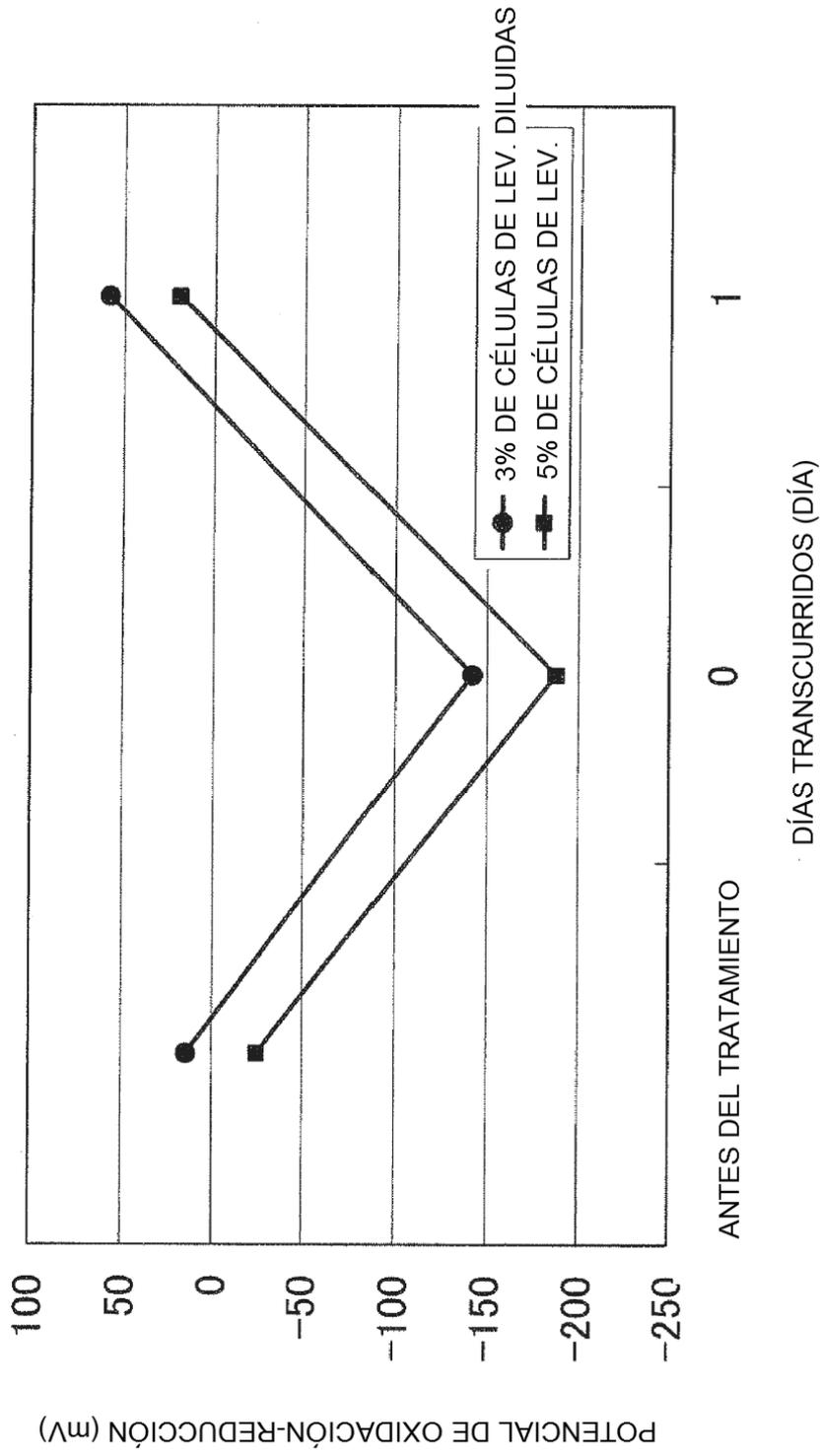


FIG. 11

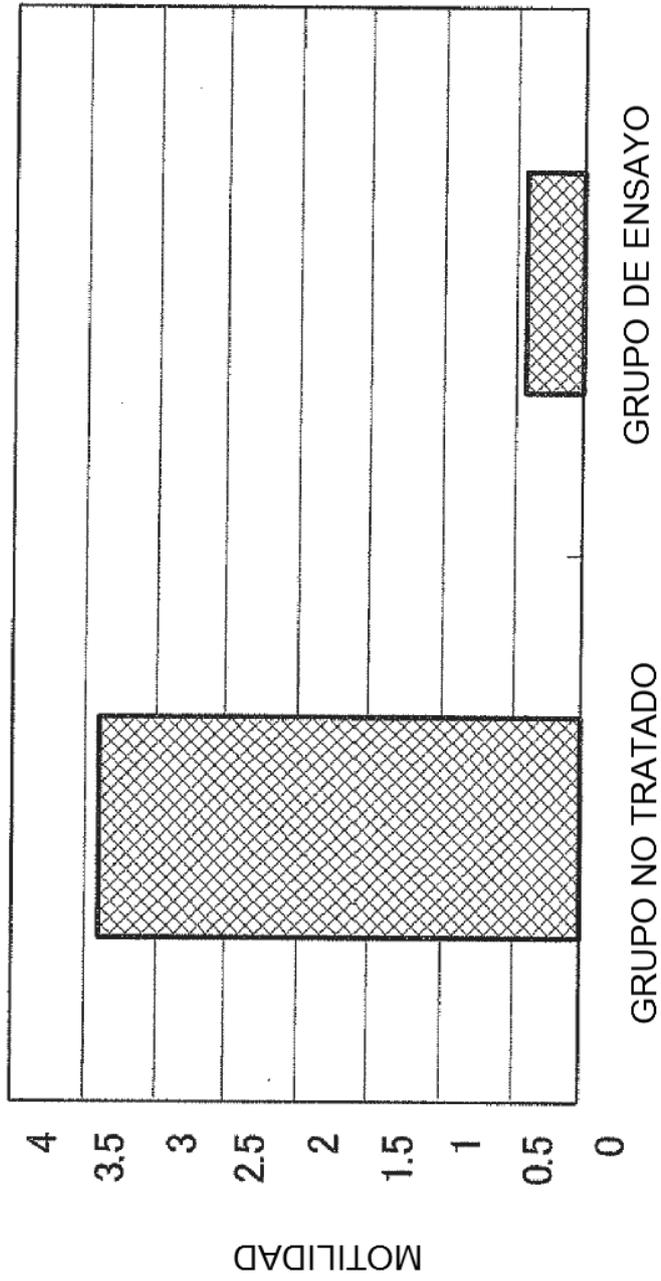
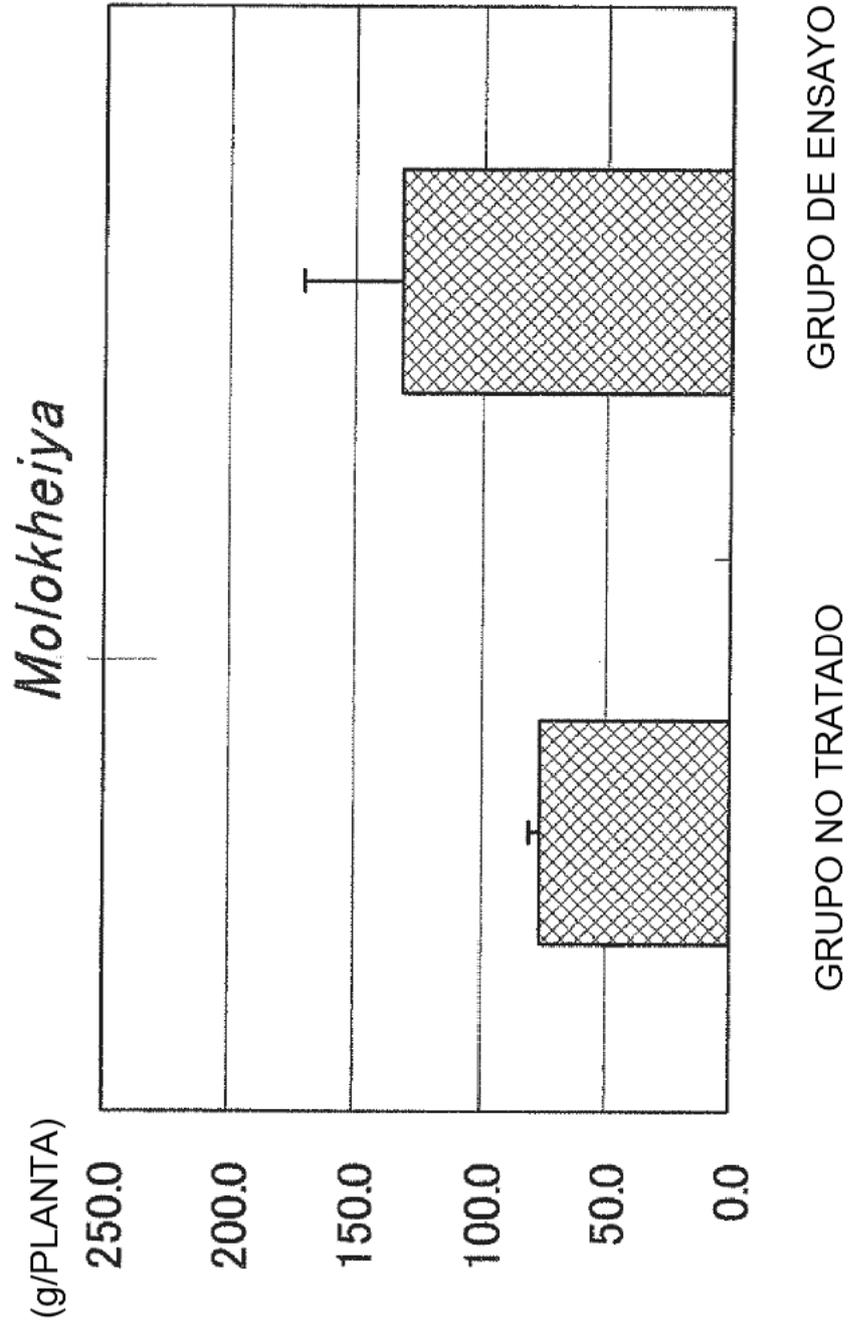


FIG. 12



**FIG. 13**  
**GARLAND CHRYSANTHEMUM**

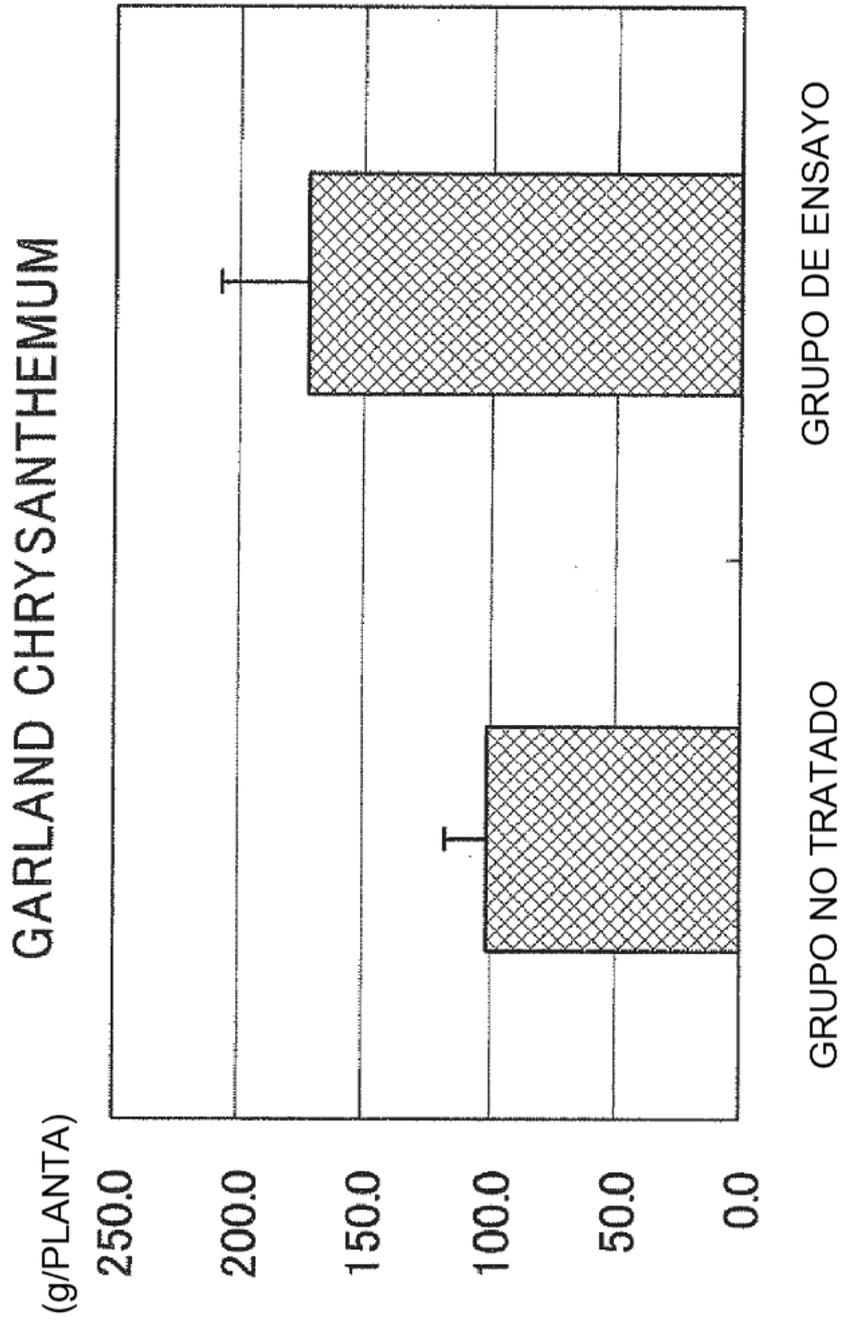


FIG. 14

