

256734



256734

MEMORIA DESCRIPTIVA
de un Certificado de 1ª Adición por:
"Mejoras introducidas en el objeto de la
Patente Principal Nº 231.293 sobre "PRO-
CEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE RESI-
DUOS DE DESTILACION DE LAS MELAZAS CON
MICROORGANISMOS"; a nombre de: JOH.A.
BENCKISER G.m.b.H., Chemische Fabrik, de
nacionalidad alemana, domiciliada en LUD-
WIGSHAFEN AM RHEIN, Frankenthaler Strasse
3, (Alemania).

... ..

El objeto del presente Certificado de adición se
refiere en forma muy particular a un medio de cultivo para
bacterias del ácido propiónico formadoras de vitamina B 12
cuyo medio se haya en esencia comprendido en el objeto de
5 la patente principal si bien con este certificado se lo-
gran mejoras sustanciales.

En los últimos años se han descrito una serie de
procedimientos para la obtención de vitamina B 12 por vía
microbiológica, los cuales hacen uso de distintos microorga-
nismos capacitados para la síntesis de la vitamina B 12. Así
10 por ejemplo, se puede emplear para ello una cepa de strepto-
myces olivaceus, la cual es cultivada con remoción y ventila-



256734

22 MAR 1960

ción simultáneas, en diferentes medios que contienen proteína.

15 Sin embargo estos procedimientos utilizan materiales de
partida de un valor relativamente grande. Principalmente para el
cultivo de bacterias propiónicas con miras a la formación de vita-
mina B 12, se han empleado bien medios sintéticos de complicada
composición, o bien materiales relativamente caros tales como,
por ejemplo solución de melaza o solución invertida de melaza
20 con adición de autolizado de levadura.

Se ha descubierto ahora que las exigentes bacterias del
ácido propiónico se pueden cultivar, bajo formación de vitamina
B 12 en el bagazo de las industrias de fermentación transforma-
25 doras de la melaza, sobre todo si al medio de dicho bagazo de la me-
laza se le agregan micelios o sus autolizados, hidrolizados o ter-
molizados. El empleo de bacterias del ácido propiónico tiene la
ventaja de que el medio de fermentación se vuelve ácido poco a
poco debido a la formación de ácido propiónico, y por esta ra-
zón se evitan infecciones por bacterias extrañas, cuya aparición
30 en los procedimientos con estreptomicetos u otros organismos po-
dría con frecuencia alterar el curso normal del proceso de fer-
mentación, sobre todo al emplear bagazos de melaza. La fermenta-
ción con bacterias propiónicas realizada bajo condiciones anaero-
bias, o sea en la que está suprimida la ventilación y un intenso
35 movimiento de remoción, es además, por consiguiente, muy econó-
mica en energía.

Todo el medio fermentado en vitamina B 12 es convenien-
temente concentrado a sequedad, y representa un valioso forraje
adicional. No obstante el líquido de fermentación o masa de
40 bacterias se puede transformar también en vitamina B 12 según pro-
cedimientos conocidos. El presente procedimiento se explica con
los ejemplos siguientes sin que, sin embargo, esté limitado a los
mismos.



256734

Ejemplo 1:

45 400 kg de aspergillus niger Mycel procedentes de la
fermentación de ácido cítrico son molidos y mezclados con 8000 l
de bagazo de melaza (contenido de deshidratante 10% aproximadamen-
te, y de azúcar invertidos 1,2%), tal y como sale después de
la precipitación del ácido cítrico en la preparación del mismo
50 microbiológica. La graduación del valor pH en pH 7,5 se hace con
lechada de cal. Acto seguido se agregan 80 kg de carbonato de
calcio para el amortiguamiento del ácido que se produce durante
la fermentación. El caldo nutritivo se esteriliza entonces una
hora a 100° C removiendolo de paso lentamente. Después del
55 enfriamiento hasta 30° C, se bombea el medio al fermentador
provisto de un agitador lento y se inocula con 2000 l de un
cultivo de propionibacterium shermanii de 24 horas de vida pro-
cedente del fermentador intermedio.

60 Este material de inoculación es obtenido a través
de tres etapas de fermentación de 20, 200 y 2000 l. El caldo
nutritivo en los fermentadores previo e intermedio se diferen-
cia del de la etapa de producción tan solo por el menor con-
tenido de carbonato de calcio de 0,2%. El cultivo preliminar
de las bacterias del ácido propiónico dura 24 horas en cada
65 etapa, y luego se traspasa el medio de fermentación al egita-
dor inmediatamente superior en condiciones esteriles.

70 La solución de fermentación es mantenida en movimiento
lento en el fermentador de producción (12 m³). La velocidad de
remoción es convenientemente de 30 - 60 revoluciones por minuto
por lo que la absorción de oxígeno por hora es de unos 6 mg
de oxígeno por litro. En el curso del desarrollo, el valor pH
vuelve a descender hasta pH 5,5. Al cabo de 96 horas, el líquido
de fermentación y las células bacterianas contienen 1,2 mg de
vitamina B12 por litro.



22
256734

75

Ahora se concentra con cuidado por evaporación todo el sedimento al vacío a 70° C hasta la consistencia siruposa y se le trata a sequedad en una torre de rociado. Se obtienen 1200 kg de un polvo con un contenido de vitamina B 12 de 10 mg por kg, el cual es utilizado como forraje adicional favorecedor del desarrollo.

80

Para la graduación inicial del pH en 7,5 además de la lechada de cal, se pueden emplear también otros álcalis, tales como lejía de sosa, carbonato sódico, solución amoniacal, carbonato amónico, lejía de potasa, y otros.

85

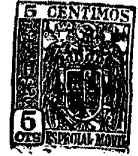
Para la neutralización de los ácidos orgánicos que aparecen por la bacteria del ácido propiónico son apropiados, además del carbonato de calcio, también los hidróxidos alcalinos o hidróxidos alcalinotérreos o hidróxido amónico, que como suspensión o solución se pueden agregar continuamente durante el proceso de fermentación. De paso hay que mantener el valor pH entre 5,5 y 7,0. Junto al *propionibacterium shermanii*, también están indicadas otras especies del genero *propionibacterium* tales como, por ejemplo *P. freudenreichii*, *P. zeae*, *P. peterssonii*, *P. pentosaceum*, y otros.

90

95

La marcha del ensayo descrita anteriormente se puede variar todavía de otra manera sin menoscabo del rendimiento en vitamina B 12. La relación de micelio a bagazo de melaza puede oscilar así dentro de amplios límites. Las cantidades empleadas para la inoculación también pueden diferir sensiblemente de las citadas más arriba. Pueden oscilar las mismas entre 5 y 35%, si bien mayores cantidades de inoculación garantizan un curso rápido y libre de infección.

100



256734

Para la mezcla íntima lenta están indicados, además de los agitadores, también bombas, maceradores de remoción así como cualquier otra clase de fermentadores en sí conocidos.

Como es sabido, el bagazo de la melaza, según sea la procedencia de esta última y el curso de la fermentación precedente, presenta ciertas fluctuaciones en cuanto al contenido de azúcar, de nitrógeno y de sal mineral. Para equilibrar estas diferencias y para asegurar un curso uniforme de la formación de vitamina B 12 se pueden agregar sustancias nutritivas y activas para las bacterias del ácido propiónico tales como por ejemplo, harina de pescado, hidrolizados de almidón o suero láctico o fosfato amónico secundario o hidrolizados de levadura o concentrados de vitamina B, y otros. También se puede hacer uso de los agentes en sí ya conocidos, tales como o-fenilenodiamina y sales de cobalto.

Ejemplo 2:

40 kg de micelios (*Aspergillus niger*) triturados y lavados, y 200 l de bagazo de melaza procedente de la fabricación de ácido cítrico se mezclan con 50 l de suero láctico y 0,25 kg de fosfato amónico secundario y 2,5 kg de carbonato de calcio, y se esterilizan durante 30 minutos a 100° C. Acto seguido se gradua el valor pH con lejía de sosa en pH 7.

Al medio obtenido se le inocula con 20 l de una suspensión espesa de *Lactobacillus casei*, el cual había sido cultivado a suero láctico bajo adición de bagazo en cultivo submerso. Al medio inoculado se le remueve lentamente en un fermentador (400 l) sin ventilación a 30° C durante 20 minutos, concluyéndose entonces la fermentación del ácido láctico.



256734

Al sedimento se le agregan ahora 0,5 g de nitrato de cobalto y se le inocula con 20 l de un cultivo de propionbacterium freudenreichii de 48 horas de vida. Al cabo de 3 - 4 días ha concluido el desarrollo y la formación de vitamina B 12, de las bacterias propiónicas. A continuación se suelta el sedimento y a la adición de 300 g de sulfito sódico se le concentra con cuidado a sequedad. Se obtiene un valioso forraje adicional.

Mediante la fermentación precedente del ácido láctico se logra un aumento del rendimiento en vitamina B 12.

Ejemplo 3.

25 kg de pileos triturados (*Aspergillus niger*), 250 l de bagazo de melaza de la fabricación del ácido cítrico, que se obtiene después de la precipitación del ácido cítrico en forma de sal cálcica, 50 l de leche fresca desnatada (la adición de leche se puede sustituir por otras fuentes apropiadas de albúmina o de hidrato de carbono, tales como harina de soja o suero láctico en polvo), 0,5 kg de fosfato amónico secundario, 25 kg de carbonato de calcio y 200 l de agua se esterilizan por cocción. Se inocula con un cultivo de una cepa - formadora de nisina - de *Streptococcus lactis* (Mattick, A.T.R.; Hirsch, A. Nature (Lond) 154 (1944) 551; Hirsch, A. : J. Gen. Microb. 5 (1951) 208). Una vez concluido el desarrollo de *Streptococcus lactis* se inocula el fermentador con 25 l de un cultivo de propionbacterium freudenreichii. Después de un periodo de fermentación de 3 - 4 días se seca el sedimento y suministra un forraje adicional con efecto antibiótico y con actividad de vitamina B 12. Merced al contenido de ácido propiónico, ácido láctico y nisina, este producto está perfectamente indicado como medios de ensilaje. Una ventaja singular es que se impide el desarrollo de bacterias del ácido butírico y que los forrajes de ensilar obtenidos contie-



256734

nen adicionalmente, la valiosa vitamina B 12.

Ejemplo 4:

165 100 l de bagazo de melaza de la fabricación de ácido
citríco por fermentación, tal y como sale después de la pre-
cipitación del ácido cítrico en forma de citrato cálcico,
se mezclan con 0,1% de fosfato amónico y 0,5% de carbonato
cálcico y se esterilizan en un correspondiente fermentador.
Después del enfriamiento hasta unos 30° C se agrega al sedi-
170 mento un 5% de micelios enmohecidos de la fermentación del
ácido cítrico sin esterilización precedente, En caso neces-
ario se gradúa el valor pH con lechada de cal ó ácido sulfú-
rico en pH 6,5 y el medio preparado de esta manera se inocula
con 10 l de un cultivo estable de bacterias del ácido propió-
nico. Al medio inoculado se le somete entonces durante 3 - 4
175 días a una fermentación anaerobia, removiendolo despacio
el mismo tiempo, a una temperatura de 25 - 30° C. A continua-
ción, con cuidado, se concentra por evaporación todo el líquu-
do de fermentación obtenido y se le seca, se obtienen 10 kg
de un producto seco que contiene vitamina B 12, que es un fo-
180 rraje adicional con excelente efecto para el desarrollo.

En lugar del micelio de la fermentación del ácido
cítrico se puede emplear también con el mismo éxito el micelio
de la fermentación del ácido glucónico o fumárico, o bien de
la fabricación de antibióticos. En la misma forma que un cul-
185 tivo estable, también es apropiado un cultivo obtenido bajo
remoción o agitación simultánea.

Ejemplo 5:

90 l de bagazo de melaza con una densidad de 1,04 y



256722MB
256734

190 son un contenido de azucar invertido de 1,2% y 10 kg de mico-
lio *Aspergillus niger* triturado procedente de la fabricación
del ácido cítrico se mezclan con 100 g de fosfato amónico
secundario, 0,8 g de cloruro de cobalto y 500 g de carbonato
cálcico. Después de graduar el valor pH en pH 7,5 con lejía
de sosa se esteriliza el medio de cultivo en un fermentador
195 por calentamiento hasta 100 ° C durante una hora. El fermen-
tador de 150 l de capacidad está equipado con un agitador
de 60 revoluciones/minuto. Cuando el medio esterilizado se
ha enfriado hasta 30° C, se inocula el sedimento bajo condi-
ciones estériles con 10 l de un cultivo de *propionbacterium*
200 *shermanii* de 48 horas de vida. El desarrollo y la forma-
ción de vitamina B 12 de las bacterias de ácido propiónico
se realiza bajo remoción lenta a 30° C. Al cabo de cuatro
días el medio contiene 2,3 mg de B 12 por l. Secando cuida-
dosamente todo el sedimento (a 70 ° C como máximo) se ob-
205 tienen 10 kg de un forraje adicional favorecedor del desarro-
llo, con un contenido de vitamina B 12 de 20 mg vit.B 12 por
kg.

210

. - I N O T A . - .

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

215

1.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente
principal N° 231.293 sobre procedimiento para el tratamiento
de residuos de destilación de las melazas con microorganismos
caracterizadas porque para la preparación de un medio de
cultivo para bacterias del ácido propiónico bajo formación
de vitamina B 12 se inocula con bacterias propiónicas el ba-
gazo, de las industrias de fermentación transformadoras de



256734

220

melaza de micelios u otros autolizados, hidrolizados, termolizados y se les somete a una fermentación anaerobia.

225

2.- Mejoras según la reivindicación 1, caracterizadas porque como bacterias del ácido propiónico se hace uso de propionibacterium freudenreichii, propionibacterium shermanii, propionibacterium zea, propionibacterium peterssonii, propionibacterium pentosaceum, y otras.

230

3.- Mejoras según reivindicación 1, caracterizadas porque después de una fermentación de ácido láctico, se inocula el substrato nutritivo con bacterias del ácido propiónico y se le somete a una fermentación anaerobia.

4.- Mejoras según reivindicación 1, caracterizadas porque después de la inoculación con formadores de nisina, el substrato nutritivo es mezclado con bacterias del ácido propiónico y sometido a una fermentación anaerobia.

235

5.- MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 231.293 sobre "PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS DE DESTILACION DE LAS MELAZAS CON MICROORGANISMOS".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva que consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22 MAR. 1960

Carb. Juanda