



283522

19 DIC 1962

283 52

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de RELIANCE CHEMICALS CORPORATION, entidad nortea-
mericana, establecida en 12405 Sowden Road, Houston, Tejas,
Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PRODUCTOS BIOLOGI-
COS UTILES"

=====

Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento
para la producción de productos biológicos útiles por el -
cultivo superficial del megaterio B sobre sustratos sólidos
y los productos del mismo. Más particularmente, la pre-
5 sente invención se refiere al procedimiento y los produc-
tos del mismo del cultivo superficial de megaterio B sobre
sustratos sólidos que son productos nutritivos para el me-
gaterio B para la producción de productos biológicos útiles
que incluyen altas concentraciones de vitaminas del comple-
10 jo B, antibióticos, f factores estimulantes del crecimien-



to no identificados, particularmente para aves de corral y cuadrúpedos.

5 La producción de estos factores y antibióticos se lleva a cabo usualmente por métodos de cultivo sumergido, es decir, el desarrollo de microorganismos en soluciones de líquido nutritivo, ya sea con aeración o sin ella.

10 Es bien sabido que muchas especies de organismos de la familia Bacillaceas producen antibióticos y factores estimulantes del crecimiento para animales, tales como Bacitracina derivada del licheniformis B, y Subtilina del subtilis B. Estas substancias se producen usualmente por el método de cultivo sumergido y deben ser altamente purificados.

15 Con motivo de la purificación necesaria para un factor, muchos factores de crecimiento no identificados se pierden o no se recuperan.

20 Un objeto de esta invención es proveer un procedimiento mejorado para la producción de factores de crecimiento no identificados y vitaminas desarrollando megaterio B sobre un substrato sólido.

25 Otro objeto más de esta invención es proveer un procedimiento mejorado para la producción de factores de crecimiento no identificados y vitaminas desarrollando megaterio B sobre un substrato sólido que es un producto nutritivo para el megaterio B.

30 Otro objeto es proveer un nuevo procedimiento por medio del cual el megaterio B se cultiva y diseca de tal manera que permanece estable y sus substancias beneficiosas pasan a ser activas cuando se incluyen en los alimentos para animales.



Otro objeto es proveer un nuevo procedimiento para la síntesis de vitaminas del complejo B, particularmente - vitamina B₁₂.

5 Todavía otro objeto más de esta invención es proveer un nuevo producto alimenticio compuesto, ya sea para el -- consumo del ser humano o animales que se caracteriza por - formas físicas distintivas y por una elevada concentración de megaterio B que provee una fuente rica de proteína, anti-
 10 tibióticos, factores de crecimiento no identificados y vi- tamina B₁₂.

Otros objetos y ventajas de esta invención serán -- aparentes mediante la siguiente descripción detallada que expone métodos ilustrativos de poner en práctica la inven- ción.

15 En la puesta en práctica, un cultivo de megaterio B rico en antibióticos, vitaminas y factores de crecimiento no identificados, puede producirse eficientemente y con -- ventaja considerable sobre las puestas en práctica anterio- res desarrollando bacteria en masas penetrables por el ai-
 20 re compuestas de partículas o gránulos sólidos separados, - recubiertos con un mosto nutritivo inoculado con megaterio B. Dichas partículas recubiertas, cuando se incuban bajo - condiciones convenientes de aeración, temperatura y hume-
 25 dad producen un crecimiento pródigo de bacteria juntamen- te con antibióticos, factores de crecimiento no identifica- dos y vitaminas.

Los gránulos o partículas así utilizados proveen -- una gran extensión superficial para retener el mosto en pe-
 30 lículas delgadas extendidas que permiten que el creciminien- to de bacteria prosiga rápida y substancialmente hasta su

conclusión bajo condiciones convenientes; y la característica granular de las partículas recubiertas permiten que -
 masas de las mismas sean aireadas por el movimiento del --
 aire en las mismas entre las partículas, para exponer con-
 5 tinuamente una gran parte de la película de recubrimiento
 a las condiciones que favorecen el crecimiento activo de -
 bacteria. De esta forma, hallamos que es posible evitar -
 muchas restricciones que acompañan el crecimiento de bac-
 teria en medios líquidos.

10 De conformidad con las formas preferidas de esta in-
 vención, pueden emplearse sustancias en forma de partícu-
 las de origen vegetal o cereal que contienen carbohidratos
 o carbohidratos y proteínas asimilables por la bacteria -
 que se desarrolla, que incluyen granos de cereales desmenu-
 15 zados o rocos, derivados granulares de granos, tales como
 harina de habas soya y vástagos de malta y preferentemente
 los afrechos o recubrimientos y gérmenes provenientes de -
 granos cereales, tales como afrecho de trigo, afrecho de -
 arroz, afrecho de maíz y análogos. Dichas sustancias pue-
 20 den utilizarse individualmente o en varias mezclas, depen-
 diendo de las cualidades y usos que se desean para el pro-
 ducto cultivado.

Mediante el uso de dichas sustancias nutritivas he-
 mos hallado que es posible desarrollar bacteria no sólo --
 25 proveniente de los productos nutritivos contenidos en el -
 mosto sino también, simultáneamente, proveniente de los --
 productos nutritivos que se derivan de las partículas recu-
 biertas con el mosto en el curso de la incubación. Las par-
 tículas tales como las que provienen de los recubrimientos
 30 y gérmenes de granos contienen proporciones comparativamen-



te grandes de carbohidratos y proteínas asimilables por la bacteria. También tienen un contenido relativamente alto -- de minerales, compuestos de nitrógeno y substancias tales como biotina que estimulan el crecimiento de bacteria.

5 También hemos descubierto que las vitaminas del complejo B pueden sintetizarse en conjunción con el crecimiento de la bacteria, hasta un grado muy superior al que se atribuye al crecimiento de la propia bacteria, empleando -- gránulos o partículas, tales como afrechos de cereales y similares, que inicialmente contienen dichos factores vitamínicos. En dichos casos el contenido vitamínico del material se ha hallado que se ha acrecentado grandemente en el curso de la incubación.

15 Cuando se utilizan partículas de cereales como las que se describen, muchas de las vitaminas B se sintetizan particularmente la vitamina B₁₂ junto con factores de crecimiento no identificados y antibióticos en grado muy superior al que se atribuye a la propia bacteria.

20 El substrato sólido, además de las partículas de cereales, debería contener desde 1% hasta alrededor de 10% -- de material proteínáceo que tiene la habilidad de producir una película plástica impenetrable por el aire alrededor -- del cultivo granulado. Dichos materiales proteínáceos incluyen la gelatina, caseína, proteínas de habas soya, semilla de algodón, y similares. La cantidad total que se utiliza de uno cualquiera o en combinación, preferentemente debería ser alrededor del 1% al 3%, pero puede llegar hasta el 10% del substrato total, dependiendo del carácter físico de -- de los productos de cereal. Debería utilizarse una cantidad que no hará al substrato muy gomoso y que todavía re--



tenga su carácter granular. Esta substancia proteínacea --
produce una película alrededor de las partículas cultiva--
das que al secarse obtura el aire y conserva el organismo y
las substancias producidas por el cultivo.

5 El mosto o medio de cultivo que se utiliza para re-
cubrir los granulos puede ser de cualquier tipo simple con-
veniente para el crecimiento bacterial que usualmente con-
tiene una base de carbohidratos tales como azúcar, dextro-
sa, fécula y una base proteínacea, como, por ejemplo, pro-
10 teinas vegetales o animales que pueden incluir sales de ni-
trógeno en cantidades convenientes. Dicho mosto, para mejo-
res resultados, debería suplementarse con sales amortigua-
doras para proveer el valor pH apropiado, tales como CaCO_3 ,
fosfato monocálcico, cal, etc. Cuando se emplean substancias
15 cereales granulares ricas en valor alimenticio, el material
de base concentrado debería ajustarse de conformidad. La -
concentración de los productos nutritivos puede ser del 2%
al 5% en suspensión en agua. Puesto que es posible y venta-
joso añadir suplementos a los cereales granulares que se -
20 utilizan como substrato, el mosto de inocular puede ser re-
lativamente simple, siempre y cuando que contenga un culti-
vo activo de la bacteria conveniente. Un pequeño vaso de -
mosto de inocular se preparar como sigue (partes en peso):

- 100 partes de agua
- 25 1 parte de dextrosa
- 2 partes de harina de habas de soya
- 2 partes de afrecho de trigo
- 2 partes de harina de pescado

La mezcla se calienta gradualmente hasta el punto -
30 de ebullición, se neutraliza con NaOH a 7,5 pH, luego se -



filtra a través de un filtro grosero. El mosto filtrado se echa entonces en frascos o en una cladera no corrosiva y se esteriliza a una presión de vapor de $1,40 \text{ kg/cm}^2$ durante 30 minutos.

5 El mosto así preparado se inocula con un caldo del cultivo por 24 horas de megaterio B e incuba durante 24 horas a 37°C .

Después de 24 horas el vaso de mosto se diluye con agua estéril empleando aproximadamente 1 parte (en peso) -
10 de mosto por 19 partes de agua o una dilución al 5%. Este mosto diluido se emplea ahora para humedecer el substrato granular que se prepara como sigue:

Las partículas de cereal sólidas se mezclan primero con suplementos apropiados y sales amortiguadoras. Se prepara una mezcla consistente en (partes en peso):

15 100 partes de afrecho de trigo
5 partes de harina de habas soya
1 parte de carbonato cálcico
1 parte de gelatina
20 1 parte de caseína

A esto se añaden y mezclan bien 100 partes de agua. Se esteriliza la mezcla entonces a 100°C con vapor en una mezcladora rotativa bajo condiciones atmosféricas durante 20 minutos a 3 horas.

25 La mezcla esterilizada se enfría ahora a 40°C y se añade aproximadamente una cantidad igual de mosto activo diluido o la cantidad de mosto que proveerá de 1,50 a 1,75 partes de líquido por 1 parte de substrato.

Las partículas esterilizadas se recubren con el mosto activo mediante la mezcla prolija durante unos pocos mi



nutos.

Cualquiera o todas las operaciones precedentes pueden llevarse a cabo por cargas o en forma semicontinua o continua, según se desee. Se comprenderá, desde luego, que las operaciones continuas son más eficientes para la producción comercial en grande escala. El cultivo de la masa recubierta puede llevarse a cabo de varias maneras empleando cualquier tipo de equipo mediante el cual masas o capas de gránulos recubiertos pueden ser aireados o inoculados eficazmente. El material recubierto se coloca usualmente en anaqueles perforados, en capas o masas de varias pulgadas de espesor, y se hace circular aire transversalmente a través de los anaqueles y las capas de material en los mismos, a una temperatura y humedad predeterminadas. Para la operación más eficiente, la profundidad de las capas usualmente es alrededor de 25,40 a 76,20 mm. Mayores profundidades pueden retardar objetablemente la circulación del aire, y profundidades menores pueden reducir innecesariamente la capacidad productiva del equipo. También pueden emplearse incubadoras corrientes que tienen recipientes o anaqueles sin perforar, pero en tales casos el procedimiento probablemente no producirá el rendimiento máximo de productos a menos que los espesores de las capas sean pequeños o las propias capas sean extraordinariamente penetrables al aire que circula sobre ellas.

Según se mencionó anteriormente, la temperatura del material durante la incubación no debería exceder de alrededor de 45° C ni descender más abajo de alrededor de 30°C. los límites óptimos son alrededor de 35° C y 40° C, de manera que el aire se suministra preferentemente a una tempe



ratura entre esos límites. Al principio del tratamiento sólo se requiere una pequeña cantidad de aire, pero a medida que progresa la incubación, debería aumentarse la circulación de aire para controlar la temperatura del material y suministrar la humedad y aire que se requieren para el crecimiento pleno de la bacteria. Para dar a la bacteria un buen comienzo, usualmente empezamos a tratar el material recubierto a alrededor de 35° C y hacemos circular el aire a alrededor de 30° C en contacto con el material. A medida que progresa la incubación, sin embargo, se genera calor que aumentaría perjudicialmente la temperatura del material en ausencia de enfriamiento. Este calor se disipa ya sea bajando la temperatura del aire o, preferentemente, aumentando el volumen del flujo de aire. Por ejemplo, usualmente seguimos suministrando aire a alrededor de 35° C y aumentamos la velocidad de flujo del aire a medida que progresa la incubación, hasta el grado necesario para mantener el material entre los límites de temperatura conveniente. El aire debería ser lo húmedo bastante para impedir un secado substancial del material de cultivo, empleándose usualmente una humedad relativa superior al 80%.

El cultivo del material continúa usualmente por un período de cuando menos 18 a 30 horas, o hasta la conclusión del crecimiento activo de la bacteria. Hacia el final del período de incubación, el material tendrá la tendencia de formar una estera. Para facilitar el secado esta estera puede deshacerse mediante la agitación. En este momento puede bajarse la humedad del aire y aumentarse la temperatura hasta un punto que no producirá un aumento de la temperatura más arriba de 45,1° C.



Después de la conclusión del período de incubación, se obtiene un producto cultivado compuesto que acusa un -- contenido muy alto de megaterio B. No es inusual obtener -- una cuenta tal alta como mil millones de bacterias por gra
5 mo sobre una base seca. Cuando se emplean partículas iner-
tes o no nutritivas como material granular, la eficiencia del procedimiento puede aproximarse al 100%, con base en -- la relación entre el crecimiento de bacteria verdadero y -- el crecimiento teóricamente asequible proveniente de los --
10 productos nutritivos contenidos en el recubrimiento de nos-
to. Cuando se emplean partículas de cereales que contienen productos nutritivos asimilables, la eficiencia usualmente es alrededor de 100% a 125%, o más. Cuando el material gra-
nular es un alrecho o similar que contiene vitaminas, el --
15 producto cultivado también acusa grandes aumentos de vita-
mina B₁₂, siendo acrecentado el contenido de la misma alre-
dedor del 100% a 300%, o más, como asimismo otros aumentos de otras vitaminas del complejo B.

Para obtener un cultivo estable, el material se di-
20 seca gradualmente a temperaturas que no averiarán la bacte-
ria o sus vitaminas. El megaterio B puede resistir tempera-
turas más altas que la bacteria corriente. La temperatura de secado del cultivo no debería exceder de 46,1° C, y de --
conformidad, el aire secador se ajusta para proveer esta --
25 condición.

A medida que secan las partículas, las substancias --
proteínicas, como la gelatina, caseína, proteínas de hari-
na de habas soya, encapsulan las partículas y bacteria y --
las conservan indefinidamente junto con las vitaminas y --
30 factores de crecimiento no identificados.



190

Se comprenderá que podrán ser hechas muchas variaciones en los detalles de las formas ilustrativas dentro del alcance de las cláusulas reivindicatorias adjuntas, pero sin apartarse del espíritu de esta invención.

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en E.U.A. el 20 de Diciembre de 1.951, bajo el número 150.947, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

N O T A

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

15

1.- Un procedimiento para la producción de productos biológicos útiles, que incluye los pasos de mezclar un cultivo activo de megaterio B en un producto nutritivo líquido para el mismo con un material portador sólido en forma de partículas, incubar la mezcla en la presencia de aire a una temperatura entre los límites de alrededor de 30° C y alrededor de 45° C por un período de tiempo suficiente para concluir el crecimiento del cultivo, y disecar el producto resultante.

20

2.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 1, en el cual dicho material portador sólido es un producto nutritivo para el megaterio B.

25

3.- Un procedimiento según se detalla en las reivindicaciones 1 y 2, en el cual dicho material portador sólido consiste en carbohidratos o proteínas o mezclas de los

30



19 DEC 1962

mismos de origen vegetal o cereal.

4.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 3, en el cual dicho material portador sólido tiene mezclado con el mismo una substancia proteínica que forma una película adaptada para formar un recubrimiento impenetrable por el aire alrededor de las partículas cultivadas al disecarlo.

5.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 4, en el cual dicha substancia proteínica consiste en gelatina, caseína, proteínas de habas soya y semilla de algodón.

6.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 3, en el cual cuando menos uno de dichos materiales es relativamente rico en vitaminas naturalmente presentes.

7.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 1, en el cual la temperatura de disecación no excede de 46,1° C.

8.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 4, en el cual dicho medio nutritivo tiene mezclado con el mismo desde alrededor de 1% a 10% en peso de dicha substancia proteínica que forma una película.

9.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 1, en el cual dicho tiempo de incubación es cuando menos 16 horas.

10.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 5, en el cual dicha substancia proteínica no es nutritiva.

11.- Un procedimiento según se detalla en la reivindicación 6, en el cual cuando menos uno de dichos materia-



19 DIC 1952

les es relativamente rico en vitaminas B₁₂.

12.- Un procedimiento para la producción de productos biológicos útiles.

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

Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

19 DIC 1952

P. A.

[Handwritten signature]
Ministro de Fomento
por el Sr. [illegible]

283522