

P.- 60.288

HOE 74/F 140K



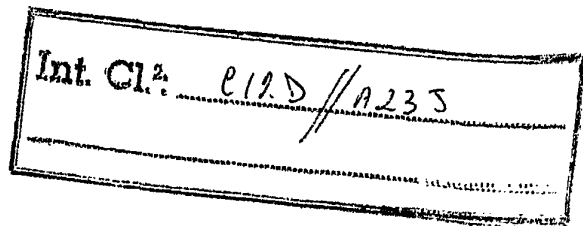
MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

437274

A nombre de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana



establecida en 6230 Frankfurt/Main 80, República  
Federal Alemana

por: " PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PROTEINAS A  
PARTIR DE BACTERIAS "

(Clase Internacional C07G, C12D)

25.4.1975



Se conocen procedimientos biosintéticos, en los cuales se reproducen por fermentación microorganismos, por ejemplo determinadas cepas de bacterias, en un medio nutritivo sintético, que como único manantial de carbono contiene metanol. Dichos procedimientos se pueden llevar a cabo tanto de modo discontinuo como también de modo continuo. Las células bacterianas obtenidas de este modo contienen en la denominada "proteína bruta" (calculadas por multiplicación del valor para nitrógeno, encontrado por análisis elemental, por factor empírico 6.25) usualmente 40-75% en peso de aminoácidos y 8-16% en peso de ácidos nucleicos. No obstante, una proporción tan elevada de ácidos nucleicos es indeseable, ya que a partir de ellos resulta, especialmente en el organismo humano, ácido úrico, que provoca la artritis o gota. Además de ello se influye desfavorablemente sobre la flora del tracto gastrointestinal.

Se ha encontrado ahora un procedimiento para la producción de bacterias con metanol en calidad de manantial de carbono y un manantial de nitrógeno en condiciones aerobias con un valor de pH entre 4,0 y 9,0, el cual está caracterizado porque se fermentan cepas de bacterias de las familias Bacillus, Pseudomonas y Flavobacterium, y sus mutantes ó variantes, de modo que la concentración de metanol en la fase del crecimiento logarit-



mico de las células bacterianas se encuentre entre 5 y 200 ppm, referido a la suspensión de cultivo.

Se prefiere una concentración de metanol que se encuentra entre 10 y 150 ppm.

5 El procedimiento se lleva a cabo convenientemente en reactores de fermentación que contienen un medio nutritivo, el cual, además del metanol mencionado, contiene como manantial de carbono sales tales como nitrato de potasio, sulfato de amonio, fosfato de amonio o amoníaco, urea o harina de soja. Además de ello contiene fosfatos, tales como di-hidrógenofosfato potásico o hidrógeno fosfato disódico, así como sales de magnesio y potasio y elementos traza, tal como están contenidos por ejemplo también en el agua corriente. Así, por ejemplo, las sales  
10 de hierro, cobre y molibdeno están presentes en muy pequeñas cantidades  
15

Puede ser conveniente añadir, especialmente a los cultivos previos, sustancias nutritivas tales como extracto de levadura, extracto de carne, extracto de hígado, glucosa u otros.  
20

El procedimiento se lleva a cabo convenientemente a temperaturas entre 20 y 45°C, preferiblemente entre 30 y 37°C.

25 Como cepas bacterianas se utilizan especies de Bacillus, especialmente cepas de Bacillus tan conocidas

30



tales como *B. subtilis* o *B. polymyxa*, y además especies de *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden utilizarse flavobacterias.

5 La suspensión de cultivo en el reactor es aireada con 0,1 a 1,5 litros de aire por litro de solución de cultivo y minuto (vvm), preferiblemente con 0,3 a 0,6 vvm. Con el fin de garantizar una buena absorción del oxígeno por las células puede agitarse de modo intenso; pueden añadirse también emulgentes. En otros sistemas de reactor  
10 diferentes de recipientes con mecanismo de agitación se debe procurar de modo adecuado una suficiente cantidad de aire, siendo favorable, debido a la volatilidad del metanol, una devolución del aire al sistema. En sistemas convencionales se ha manifestado como ventajoso utilizar uno,  
15 o mejor todavía, dos o mas agitadores en un recipiente de fermentación. Además de ello, es ventajoso disponer dos agitadores, especialmente agitadores de discos perforados, en el recipiente de fermentación de manera tal que las distancias entre agitadores tengan una magnitud de aproximadamente un diámetro de agitador. La proporción de diámetro de agitador a diámetro del recipiente se encuentra  
20 convenientemente en valores entre 0,35 y 0,65, preferiblemente entre 0,45 y 0,55. La velocidad de circulación de la suspensión de cultivo es convenientemente mayor en 7 m/segundo.

25 Caso de que aparezca formación de espuma se



aconseja una represión por vía química o mecánica de la espuma, por ejemplo por adición de 0,01 a 0,1% en peso de un agente desespumante, tal como octanol, ésteres de ácido oleico y ácido láurico con glicol, glicerina o sorbita, solución alcohólica de colestestina, o siliconas tales como polidimetilsiloxano.

La concentración de metanol entre 5 y 200 ppm, preferiblemente entre 10 y 150 ppm, puede ser controlada de modo continuo mediante diferentes medidas, por ejemplo por medición del consumo de nitrógeno, de la proporción de masa celular o preferiblemente por medio de la descarga de dióxido de carbono. En tal caso es posible una dosificación de precisión de la adición de metanol con reacción rápida sobre la descarga de dióxido de carbono, que disminuye en el caso de déficit de carbono. Preferiblemente, este control puede efectuarse mediante la medición de la cantidad de metanol gaseoso mediante un detector por ionización de llama.

Cuando el valor del pH de la suspensión de cultivo disminuye por debajo del valor prescrito, es llevado, por adición de un álcali, por ejemplo lejía de sosa o lejía de potasa, de nuevo al valor prescrito. Asimismo, un valor de pH demasiado elevado es regulado mediante adición de un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

Para el control del procedimiento se toman



muestras de la suspensión de cultivo, con el fin de determinar el peso en seco y el contenido de nitrógeno en la masa celular bacteriana. Después de ello se pueden determinar las velocidades de crecimiento y el tiempo de duplicación de la masa celular. Cuando el peso en seco de las células ya no aumenta de modo logarítmico en tomas de muestras sucesivas, se termina la fermentación en el caso de un modo de trabajo discontinuo. En el caso de un modo de trabajo continuo, la producción de biomasa en el reactor se controla mediante el grado de dilución.

La separación de la masa bacteriana se efectúa de modo usual por centrifugación, lavando varias veces con agua. También se han acreditado procedimientos en los que por floculación con ácidos a un valor de pH entre 2 y 6 se puede concentrar la masa celular. Puede ser también conveniente alcalinizar primero la suspensión de cultivo, convenientemente a un valor de pH entre 8 y 11, preferiblemente entre 8 y 9, luego calentar durante breve tiempo a 60 hasta 95°C, y después del enfriamiento acidificar tal como precedentemente se ha indicado. Además de ello la separación por floculación pueden ayudarse mediante adición de sales de hierro o de aluminio o de agentes auxiliares de floculación de origen natural tales como, por ejemplo, almidón o cola, o de origen sintético tales como, por ejemplo, poli-acrilamida, poliacrilatos, polietileniminas o poli(óxidos



de etileno). De este modo se obtiene una masa celular bac-  
teriana a modo de pasta, que contiene todavía 75 a 90% en  
peso de agua. El secado puede efectuarse de diferentes ma-  
neras, por ejemplo mediante secado en rodillos, secado en  
5 lecho fluidificado o secado por atomización. El producto  
así secado contiene solamente 2 a 5 % en peso de agua y 60  
a 80% en peso de proteína bruta. En esta proteína bruta la  
proporción de aminoácidos es de 90 a 95% en peso. En este  
caso es digno de mención el hecho de que no sólo estas pro-  
10 porciones de aminoácidos en general, sino especialmente los  
contenidos de aminoácidos esenciales y semiesenciales, son  
mayores que en productos comparables obtenidos de acuerdo  
con el estado conocido de la técnica. Además de ello, el  
contenido de cenizas brutas de la masa celular secada, obte-  
15 nida de acuerdo con el invento, es claramente más bajo que  
el de los productos conocidos. La proteína bruta obtenida  
de acuerdo con el invento contiene, además de ello, sólo 5  
a 10% en peso de ácidos nucleicos, mientras que los productos  
conocidos contienen 8 a 16 o más % en peso de ácidos nucleí-  
20 cos.

La masa bacteriana seca obtenida de acuerdo  
con el procedimiento según el invento es apropiada por lo  
tanto en grado especial para servir como manantial proteí-  
nico en alimentos y en piensos para animales.

25



Ejemplo 1.

La cepa *Pseudomonas* sp. ATCC 31061 (PH-B-5163), que es mantenida en el tubito de agar inclinado con la composición

5	2,5 % extracto de carne		1,0 % metanol
	5,0 % extracto de levadura		0,2 % $\text{NaNO}_3$
	10,0 % peptona de carne		0,02 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10,0%	10,0 % glucosa	+ 90 %	0,02 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	10,0 % NaCl		0,009 % $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
10	2,5 % agar		0,004 % KCl
			0,00015 % $\text{CaCl}_2$
			0,0001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
			vestigios $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
			" $\text{H}_3\text{BO}_3$
15			" $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
			" $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
			" $\text{Na}_2\text{HOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
			(pH 6,6)

20 es sumergida con 4 ml de agua destilada o de solución fisiológica de sal común y es sobreinoculada de modo estéril en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, que contiene 250 ml de solución nutritiva de cultivo previo con la siguiente composición:

25



5                   0,53 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
                  0,4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                  0,2 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$   
                  0,02 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
                  0,02 % KCl  
                  1,5 % metanol y  
                  0,1 % elementos traza  
                  (pH 6,8)

10                   El procedimiento de acuerdo con el invento  
se realiza en un recipiente de fermentación con una capaci-  
dad de 14 litros, que está cargado con 10 litros de la si-  
guiente solución nutritiva:

15                   1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
                  0,4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                  0,2 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$   
                  0,02 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
                  0,02 % KCl

20                   El valor del pH de la solución nutritiva es  
de 6,8. Esta es esterilizada durante 45 minutos a 121°C.  
Además se añaden a la solución nutritiva 50 g (0,5% en peso)  
de metanol antes de la inoculación del cultivo principal.

25                   Para la inoculación de la solución nutritiva

30 APR 1957  
BIBL. N.º 1000  
BIBL. N.º 1000

se utilizan en condiciones estériles 2 veces 250 ml del cultivo previo, que había sido agitado a 30°C durante 24 a 48 horas. La solución nutritiva inoculada de este modo es agitada, en el caso del modo de trabajo discontinuo, durante  
5 24 a 36 horas a 30°C con aireación con 0,06 vvm de aire con un agitador de turbinas.

Una corrección del valor del pH se efectúa en caso necesario por adición de HCl estéril 2 N. Durante la fase logarítmica de la fermentación discontinua, así como en el caso del modo de trabajo continuo, se mantiene una  
10 concentración de metanol situada entre 5 y 150 ppm. % en peso. A esto, en el caso de una disminución de la descarga de CO<sub>2</sub> de las células, se añaden dosificadamente de modo automático porciones adicionales de metanol hasta que aumenta  
15 de nuevo la descarga de CO<sub>2</sub>. Esto puede efectuarse asimismo por medición de la porción gaseosa de metanol en el aire de escape mediante un detector por ionización de llama.

El progreso del procedimiento se controla mediante tomas de muestras con el fin de determinar el peso en seco y la cantidad del nitrógeno de la masa celular bacteriana.  
20

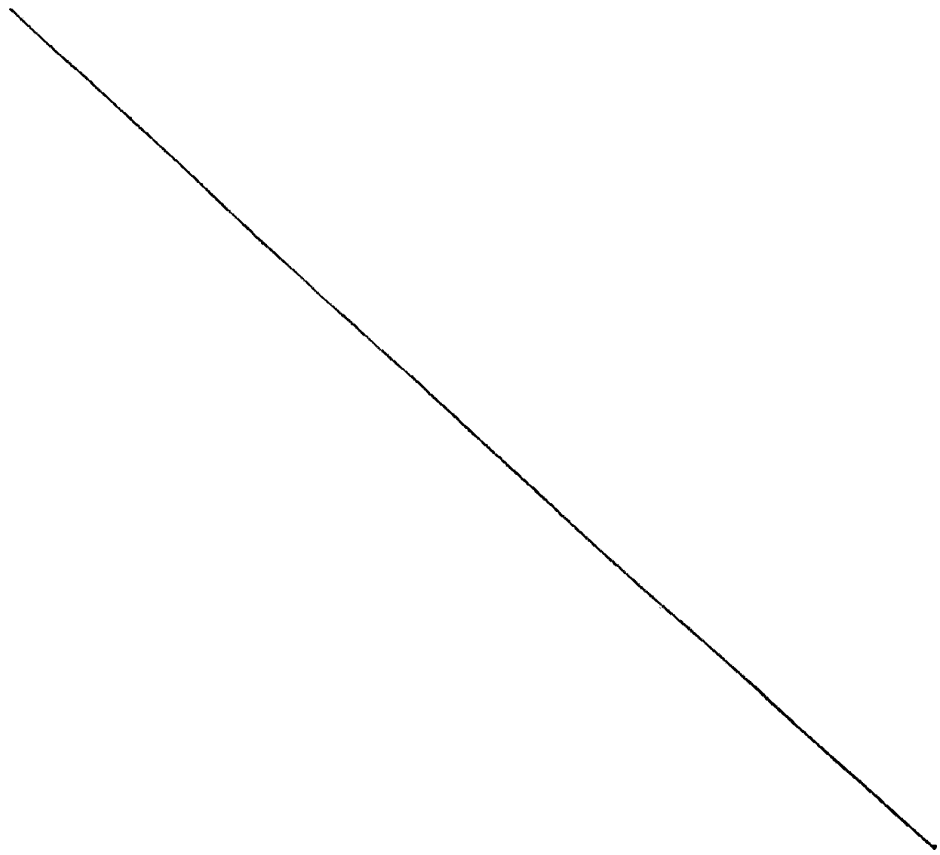
Después de terminada la fase de crecimiento logarítmico el tratamiento se lleva a cabo de modo usual por centrifugación o floculación, lavado de las células con  
25 agua y subsiguiente secado por atomización. El producto

30 13



así obtenido tiene un contenido de proteína bruta de 71,87% en peso, un contenido de aminoácidos de 66,55% en peso y una proporción de ácidos nucleicos de 9,8% en peso. Los aminoácidos esenciales y semiesenciales constituyen sólo 46,47% en peso (con glicina).

En la siguiente Tabla 1 se encuentran datos detallados.





T A B L A 1

Producto	Bacterias FH-B-5163
Proteína bruta (N x 6,25) %	71,87
Contenido de agua %	
Cenizas brutas %	
Grasas brutas %	
Fibras brutas %	
Contenido de aminoácidos %	66,55
Aminoácidos g/16 g de N	
Asp	9,50
Thr	4,63
Ser	3,08
Glu	11,57
Pro	4,15
Gly	6,05
Ala	8,41
Cys	no determinado
Val	6,19
Met	3,85
Ile	3,92
Leu	7,45
Tyr	2,09
Phe	3,55
His	1,89
Lys	5,90
Arg	7,33
Try	no determinado
Contenido de ácidos nucleicos %	9,8



### Ejemplo 2.

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 21996 (FH-N-845) es cultivada como en el Ejemplo 1. Adicionalmente, a un recipiente de fermentación con una capacidad de 14 litros se agregan 9 litros de solución nutritiva con la composición indicada en el Ejemplo 1, y a esto se añade 0,5% en peso de metanol. La solución nutritiva es inoculada del modo que se indica en el Ejemplo 1 y es agitada a 3°C, aireando con 0,6 vvm de aire, con un agitador de turbinas a 210 rpm. El valor del pH es mantenido a 8,0 eventualmente por adición de HCl estéril. Durante la fase logarítmica de la fermentación se mantiene una concentración de metanol entre 50 y 100 ppm. La regulación de esta concentración, el control del procedimiento así como la separación y el tratamiento de la masa celular obtenida se efectúan del modo que se describe en el Ejemplo 1. Después de secado por atomización se obtiene un producto con un contenido de proteína bruta de 75,8% en peso, un contenido de aminoácidos de 67,0% en peso y un contenido de ácidos nucleicos de 8,5% en peso.

### Ejemplo 3.

La cepa *Flavobacterium* sp. ATCC 31062 (FH-B-5108) es cultivada primero, tal como se describe en el Ejemplo 1, en un recipiente de fermentación con una capacidad de 10 litros. La suspensión de cultivo así obtenida es



transferida luego a un recipiente de fermentación con una capacidad de 200 litros, que esta cargado con 150 litros de la siguiente solución nutritiva:

5	1	%	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0,4	%	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	0,2	%	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
	0,2	%	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
	0,02	%	$\text{NaCl}$
	0,02	%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
10	0,5	%	metanol

El valor del pH de la solución nutritiva es ajustado a 6,5 con ácido fosfórico semiconcentrado. A continuación se esteriliza a 120°C y 1,4 atmósferas manométricas durante 20 minutos. Después de la esterilización el pH es de 6,7. El metanol es añadido por separado.

A continuación el cultivo es fermentado durante 24 a 36 horas a 35°C aireando con 1,1 vvm, a una presión de 0,3 atmósferas manométricas, agitando con 2 agitadores de 250 rpm. Durante la fase logarítmica de la fermentación se mantiene una concentración de metanol entre 50 y 120 ppm, añadiéndose porciones adicionales de metanol en el caso de una disminución de la descarga de dióxido de carbono, hasta que vuelva a aumentar dicha descarga de dióxido de carbono. el valor del pH es mantenido entre 7,9 y 8,4 por adición de

30 APR 1975

HCl estéril. El progreso del procedimiento y el momento de su terminación son determinados del modo que se indica en el Ejemplo 1.

5 La suspensión de cultivo obtenida de este modo es utilizada como material de inoculación para un recipiente de fermentación con una capacidad de 2.000 litros. La solución nutritiva tiene la misma composición y el mismo valor de pH que precedentemente se indica para la fermentación detallada en último término. El reactor de fermentación es esterilizado durante 20 minutos a 120°C y 1,4 atmósferas manométricas, agitando a 210 rpm. Después de la esterilización el valor del pH es de 6,8.

10 La subsiguiente fermentación se lleva a cabo a 35°C, aireando con 0,6 vvm, con una presión de 0,3 atmósferas manométricas y con 2 agitadores de 210 rpm. El valor del pH es mantenido durante la fermentación entre 7,9 y 8,4 con HCl estéril.

15 El progreso del procedimiento se vigila mediante tomas de muestras para comprobar la esterilidad, para la medición del pH, para la determinación del peso en seco y del nitrógeno de la masa celular bacteriana.

20 La concentración de metanol es mantenida entre 10 y 150 ppm durante la fase de crecimiento logarítmico y es repuesta a medida que se desarrolla la descarga de dióxido de carbono, del modo que precedentemente se describe.



Después de terminarse la fase de crecimiento logarítmico, la suspensión de cultivo es calentada durante breve tiempo a 55°C y luego es enfriada a 18°C. El valor del pH se encuentra entre 8,0 y 8,5.

5                    2.000 litros de la suspensión de cultivo obtenida de este modo, con un contenido de 20 g de masa seca por litro, son centrifugados en una centrífuga tubular con una aceleración de 15.000 veces la gravedad con un caudal de 400 litros/hora. Las células bacterianas húmedas separadas de este modo son sumergidas en agua desalinizada para formar una suspensión con un contenido de 10 a 15% en peso de masa seca, y son agitados vigorosamente a 15 hasta 18°C en un recipiente apropiado. De este modo, durante aproximadamente una hora se eliminan por lavado impurezas, sustancias acompañantes y componentes de la solución nutritiva. Después de efectuar nuevamente la centrifugación se prepara con agua desalinizada una suspensión al 20 hasta 25% en peso de bacterias, se agita ésta en las mismas condiciones y se centrifuga de nuevo. Las células bacterianas lavadas de este modo son sumergidas para formar una suspensión al 40 hasta 50% en peso y son sometidas al secado por atomización.

20                    De este modo se obtienen 37 kg de un producto celular inodoro de color claro, que contiene 73,7% en peso de proteína bruta, 61,0% en peso de aminoácidos - de ellos



49,0 % en peso de aminoácidos esenciales - y además 10,5% en peso de ácidos nucleicos.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, con fecha 16 de Mayo de 1974, bajo el número P 24 23 762.5 y con fecha 27 de Agosto de 1974, bajo el número P 24 40 948.1, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

#### REIVINDICACIONES

15

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Procedimiento para la preparación de proteínas a partir de bacterias con metanol en calidad de manantial de carbono y un manantial de nitrógeno en condiciones aerobias a un valor de pH entre 4,0 y 9,0, caracterizado porque se fermentan cepas de bacterias de las familias Bacillus, Pseudomonas y Flavobacterium, y sus mutan

25

Rg



tes o variantes, de modo tal que la concentración de metanol en la fase del crecimiento logarítmico de las células bacterianas se encuentre entre 10 y 150 ppm, preferiblemente entre 50 y 100 ppm, referido a la suspensión de cultivo.

5                   2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la concentración de metanol se encuentra entre 10 y 150 ppm.

                  3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque la suspensión de cultivo es aireada con 0,3 a 0,6 volúmenes de aire por volumen de suspensión y por minuto.

10

                  4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque la suspensión de cultivo es agitada con 50 hasta 210 revoluciones por minuto.

15                   5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un recipiente que contiene por lo menos 2 agitadores de discos perforados, encontrándose la proporción de diámetro de agitador a diámetro de recipiente entre 0,35 y

20                   0,65, y ascendiendo la distancia entre 2 agitadores a la magnitud de un diámetro de agitador.

                  6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en reactores que pueden ser hechos girar por medios mecánicos, hidrodinámicos y neumáticos.

25



7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan especies de Pseudomonas, y sus mutantes o variantes.

5 8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan especies de Bacillus, y sus mutantes o variantes.

9ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan especies de Flavobacterium, y sus mutantes o variantes.

10 10ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque la concentración de metanol es controlada por medición de la descarga de dióxido de carbono.

15 11ª.- Procedimiento para la preparación de proteínas a partir de bacterias.

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

La presente Memoria consta de diecinueve hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

20

Madrid, 30 ABR. 1975

P.A.

Fernando de Elizburu  
Por Poder.

25

27.4.75  
JGM/