

ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	12 A1
21	450504	
22	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
75 24509	6 Agosto 1975	Francia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12C, C12D	---

54 TITULO DE LA INVENCION
"Procedimiento de realización de reacciones enzimáticas"

71 SOLICITANTE (S)
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (I.N.R.A.)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
149 Rue de Grenelle, 75 París 7, Francia

72 INVENTOR (ES)
Charles Divies

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
M. Curell Suñol

329 233
EX-FR

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

por VEINTE años

solicitada en España a favor de INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (I.N.R.A.), de nacionalidad francesa, domiciliada en 149 Rue de Grenelle, 75 París 7, Francia, por "Procedimiento de realización de reacciones enzimáticas", con prioridad de la solicitud francesa 75 24509 de fecha 6 Agosto 1975. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento de realización de reacciones enzimáticas que utilizan microorganismos incluidos en una matriz de polímeros. - - - -

5. La importancia de las reacciones enzimáticas en el campo industrial no va a demostrarse ahora puesto que no existe prácticamente por ejemplo ningún campo de la química orgánica en el cual no se hayan introducido reacciones enzimáticas. Sin embargo, la realización de estas reacciones presenta ciertos problemas que no han sido, hasta el presente, resueltos de forma totalmente satisfactoria. Se pasará revista a continuación a los principales modos de realización de las reacciones enzimáticas sin dar ejemplos precisos, dado
- 10.

que éstos son muy numerosos y bien conocidos. - - - - -

El primer modo de realización de las reacciones enzimáticas consiste en aislar las enzimas a partir de los microorganismos y utilizarlas a continuación, o bien en forma libre, o bien embebidas en matrices de polímeros como simples catalizadores. Estos procedimientos son, en general, muy onerosos puesto que en la mayor parte del tiempo el aislamiento de la enzima reclama una técnica compleja. Estos son pues procedimientos reservados a síntesis a pequeñas escalas de productos tales como por ejemplo algunos medicamentos. - - - - -

5.

10.

Otro modo de realización de las reacciones enzimáticas, utilizado en particular para el tratamiento de los efluentes, consiste en hacer crecer las bacterias en una solución que contiene los compuestos a degradar, por ejemplo el lactosuero de las queserías, y los elementos de un medio de cultivo, y se trata de una fermentación en estado no estacionario. En este caso, se puede conservar una actividad enzimática relativamente constante puesto que los microorganismos muertos son reemplazados continuamente. Pero, además de los problemas referentes al cultivo de microorganismos libres que hacen que se tenga en general que utilizar los procedimientos en discontinuo, el crecimiento se realiza bastante a menudo en perjuicio de la actividad enzimática global de la reacción. Así, el rendimiento de la fermentación cítrica de Aspergillus niger está condicionado por una carencia del medio en nitrógeno y otros elementos. - - - - -

15.

20.

25.

Por esto, en ciertos modos de realización de las reacciones enzimáticas con microorganismos libres, se prefiere utilizar como medio de reacción una solución que contiene el producto a tratar y un medio de cultivo pobre o incluso sin ningún medio de cultivo; ello se realiza para frenar el crecimiento de los microorganismos y favorecer su actividad enzimática y se trata de una fermentación en estado estacionario; se constata sin embargo que la actividad enzimática decrece entonces bastante rápidamente en el tiempo. - - - -

5.

10.

En estos modos de realización, el inconveniente principal es sin duda que los microorganismos, en particular las bacterias, constituyen unos productos difíciles de manipular y, en particular, no pueden constituir los rellenos de las columnas de reacción. - - - - -

15.

A fin de evitar este inconveniente se han realizado rellenos constituidos por unos microorganismos adsorbidos sobre un soporte. Las experiencias han demostrado que se trataba de cultivos no estacionarios, que presentan por tanto algunos de los inconvenientes citados más arriba. Es preciso observar además que este tipo de relleno, cuya actividad tiene lugar en la superficie, no tiene un coeficiente de eficacia tan grande como un relleno cuya actividad esté repartida por todo el volumen. - - - - -

20.

25.

Las investigaciones recientes se han centrado en la preparación de formas más manejables y más activas de microorganismos, incluyendo estos últimos en unas matrices de

- polímeros, por ejemplo por polimerización de una solución que contiene el monómero y el microorganismo. Esto pone a disposición de la industria unos granulados de polímeros que presentan una actividad enzimática semejante a la de los microorganismos incluidos. Hasta ahora, estos granulados de polímeros eran considerados igualmente que las enzimas bloqueadas en unas resinas descritas anteriormente con la diferencia de que, bajo esta forma, por otra parte más económica, la actividad de los microorganismos incluidos es, en general, inferior a la de las enzimas bloqueadas. Se consideraba en efecto que, teniendo en cuenta el volumen del microorganismo en la matriz de polímeros, no podía desarrollarse y no presentaba interés más que como modo de utilización particularmente cómodo de las enzimas que contenía. Por ello, en las reacciones en continuo que utilizan polímeros que contienen microorganismos bloqueados, se alimenta el reactor con una solución que contiene únicamente el producto a tratar. Se observa entonces, en general, un descenso de la actividad de los granos de polímeros al cabo de un cierto tiempo lo que obliga a renovar el relleno del reactor. - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

Ahora bien, se ha constatado, de manera totalmente sorprendente, que era posible realizar reacciones enzimáticas que utilizan microorganismos incluidos en una matriz de polímeros sin que, con el tiempo, hubiera descenso notable de la actividad enzimática de éstos. - - - - -

25.

Para ello, la presente invención propone un procedimiento para la realización de reacciones enzimáticas que

- utilizan unos microorganismos incluidos en una matriz de polímeros, caracterizado porque se alimenta un reactor que contiene los microorganismos incluidos en una matriz de polímeros con un medio de crecimiento de dichos microorganismos
5. que contiene el o los productos a tratar y porque se extraen los productos de la reacción manteniendo los microorganismos incluidos en el reactor. - - - - -

- Este procedimiento es más particularmente interesante cuando se realiza en continuo, es decir cuando se alimenta en continuo un reactor que puede presentarse en una forma cualquiera tal como una columna con relleno o un reactor de desbordado con un medio de crecimiento de los microorganismos que contiene el o los productos a tratar y en el cual se extrae en continuo los productos de la reacción manteniendo los microorganismos incluidos en el reactor. - - -
- 10.
- 15.

- Este procedimiento presenta numerosas ventajas. Por una parte, los microorganismos incluidos en una matriz de polímeros pueden ser fácilmente manipulados e introducidos en el reactor en forma de rellenos, por ejemplo. Por otra parte, se deduce de los conocimientos actuales del solicitante que los microorganismos incluidos no sufren prácticamente crecimiento y por tanto que la actividad enzimática global del medio no se modifica como se produce cuando se cultivan microorganismos libres en un medio de crecimiento.
- 20.
25. Pero no hay descenso de la actividad enzimática como puede observarse cuando se utiliza un medio de cultivo pobre. - -

Este fenómeno, a priori sorprendente, puede ser ex
plicado al parecer de la forma siguiente (sin embargo, esta
explicación teórica no puede en ningún caso limitar el alcan
ce de la presente invención): - - - - -

5. Los microorganismos incluidos en una matriz de po-
límeros están prácticamente en la incapacidad de proliferar
por razones de volumen estérico y aunque sean alimentados
por un medio de crecimiento, pero se ha constatado que estos
microorganismos incluidos presentaban una tasa de renovación
10. ("turnover") de sus proteínas muy importante cuando se ali-
mentaban con el medio de crecimiento, lo que podría explicar
el mantenimiento de la actividad enzimática. - - - - -

- Evidentemente, esta renovación de las proteínas no
puede realizarse en un medio pobre de cultivo de bacterias
15. libres en estado estacionario puesto que se han eliminado vo-
luntariamente, en este medio, algunos elementos que favore-
cen el crecimiento de los microorganismos y la síntesis de
las proteínas. - - - - -

- En un modo de realización preferido del procedimiento
20. según la presente invención, el polímero utilizado es una
poliacrilamida. - - - - -

- Es posible realizar la utilización de este procedimi
25. ento por uno de los métodos bien conocidos en esta técnica,
por ejemplo la de HICKS y UPDIKE (1966). - - - - -

- Desde luego, se pueden utilizar polímeros distin-

tos de la poliacrilamida, bajo reserva de que se pueda incluir en los mismos unos microorganismos sin que éstos sean destruidos y que además estos microorganismos puedan ejercer su actividad enzimática sobre una solución exterior a los polímeros. - - - - -

5. La solución de alimentación del reactor que contiene el producto a tratar comprenderá además, en general, como es conocido en la técnica biológica: una fuente de carbono asimilable, tal como unos hidratos de carbono: glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, sucrosa y pentosa; melaza, almidón y los ácidos carboxílicos metabolizables; una fuente de nitrógeno asimilable, tal como los compuestos orgánicos nitrogenados: peptona, extractos de levadura, extractos de carne, aminoácidos o bien unos compuestos inorgánicos nitrogenados, sal de amonio por ejemplo; y una fuente de sales inorgánicas como el monofosfato de potasio, el acetato de sodio, etc. Esta solución podrá comprender, además, otros ingredientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, tales como vitaminas, oligoelementos o factores de crecimiento. - - - - -

10. Desde luego, en ciertos casos, el producto a tratar realizará la función de fuente de carbono, de nitrógeno, etc., o bien contendrá ciertos elementos necesarios para el crecimiento. - - - - -

15. Los otros parámetros de la reacción tales como el pH y la temperatura serán, en general, ajustados como cuando tiene lugar el cultivo en crecimiento de los microorganismos.

5. En uno de los modos de realización del procedimiento según la presente invención, el microorganismo incluido es una bacteria del género Lactobacillus, en particular una bacteria Lactobacillus casei o Lactobacillus delbruckii que permite la preparación del ácido láctico a partir del ácido málico o a partir de azúcar. - - - - -

10. En otro modo de realización de un procedimiento según la invención, se utiliza como microorganismo una bacteria del género Pseudomonas y más particularmente Pseudomonas aeruginosa con el fin de efectuar una desnitrificación; para ello se adicionan, a la solución a tratar que contiene nitratos, unos compuestos que permiten el crecimiento de esta bacteria, en particular una fuente de carbono. - - - - -

15. En otro modo de realización del procedimiento según la invención, con el fin de realizar la fermentación alcohólica, el microorganismo incluido es una levadura del tipo Saccharomyces o Schizosaccharomyces, por ejemplo Saccharomyces cerevisiae o Schizosaccharomyces pombe. En este caso, se alimenta el reactor con una sustancia que contiene azúcares tal como las melazas, mostos o zumos de frutas. En el caso de las melazas, por no constituir éstas un medio de crecimiento suficiente, se deberá adicionar una fuente de nitrógeno tal como el sulfato de amonio. - - - - -

20.

25. Desde luego, si los modos de realización del procedimiento descrito precedentemente son particularmente interesantes, el procedimiento según la presente invención puede

realizarse para otras reacciones enzimáticas que utilizan tanto bacterias, como levaduras u hongos. - - - - -

5. El procedimiento según la presente invención es más particularmente utilizable en la realización de reacciones enzimáticas que utilizan unos microorganismos mutantes que presentan unos equipos enzimáticos particularmente interesantes pero, por otra parte, presentan en general una tasa de crecimiento bastante baja incluso sobre medios ricos y que, en las condiciones de la presente invención, darán unos resultados particularmente interesantes. - - - - -
- 10.

EJEMPLO 1

Preparación de los microorganismos incluidos en un gel de poliacrilamida

15. Estos geles se preparan por el procedimiento descrito por HICKS y UPDIKE (1966). Se cultiva el microorganismo en un medio de crecimiento, llamado medio rico, que contiene el producto a tratar a fin de inducir la síntesis de la enzima correspondiente. Las células son a continuación lavadas y centrifugadas en un tampón fosfato a pH 7. - - - - -

20. Se efectúa a continuación la polimerización propiamente dicha de la forma siguiente: el microorganismo es puesto en suspensión en un tampón fosfato 0,05 M (pH 7) a la temperatura de 15°C, conteniendo por 100 ml de solución, 8,2 g de monómeros: acrilamida + N,N-metilen-bis-acrilamida (81% de acrilamida) y como catalizador 200 mg de persulfato de
- 25.

amonio y 40 microlitros de N,N-N',N'-tetrametilendiamina. La polimerización se efectúa por mantenimiento de la solución a 15°C durante de 1 a 2 minutos con inyección de nitrógeno. -

5. El gel así obtenido es entonces abundantemente aclarado con una solución acuosa y después molido a partículas de unos milímetros que constituirán el relleno de los reactores descritos en los ejemplos siguientes. - - - - -

EJEMPLO 2

Transformación del ácido L-málico en ácido

10. L-láctico

El reactor utilizado en esta experiencia es un frasco de cultivo de tejido (Celstir) en el cual la extracción de los productos de la reacción se efectúa por desbordado a través de un filtro recubierto por una membrana de nylon que permite la retención de las partículas en el medio. La agitación del medio se obtiene con la ayuda de una barra magnética suspendida, lo que evita pulverizar los granos de polímero que descansan en el fondo del reactor. - - -

20. El microorganismo utilizado en este procedimiento es una cepa de Lactobacillus casei depositada en la colección del I.N.R.A. de Montpellier bajo el N° CAP₁C₁. Estas bacterias son cultivadas sobre un medio de cultivo que presenta la composición siguiente: - - - - -

25. Extracto de levadura (Difco) 4 g
 Triptona (Difco) 2 g

5. KH_2PO_4 2 g
 Solución de sales minerales de
 SKEEGS y WRIGHT (*) 5 ml
 Zumo de tomate clarificado 80 ml
 Glucosa 10 g
 Acido DL-málico 8 g
 Agua, q.s.p. 1 litro
 - pH ajustado a 4,7 con sosa 10 N

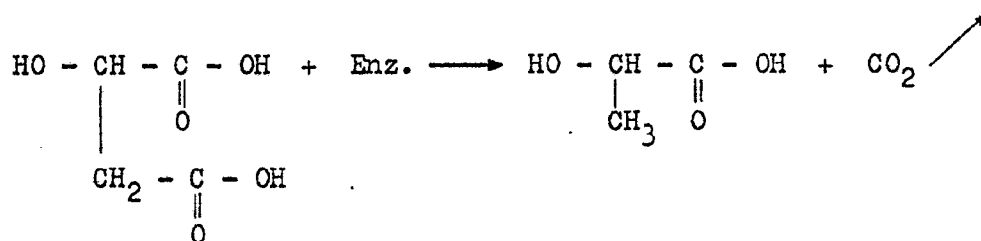
10. (*) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 40 g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 2 g/l; FeCl_3 : 0,4 g/l y
 1 ml/l de HCl puro;

esterilizados 20 minutos a 110°C. Un litro de este medio pro-
porciona al cabo de 48 horas 950 mg de bacterias en peso se-
co que sirven para la preparación de 50 mg de partículas de
polímero como ha sido descrito en el ejemplo 1. - - - - -

15. El reactor es alimentado por un medio (A) que tie-
ne la composición siguiente: - - - - -

- Extracto de levadura (Difco) 4 g
 Triptona (Difco) 2 g
 Zumo de tomate 80 ml
20. KH_2PO_4 2 g
 Glucosa 1 g
 Acido DL-málico 8 g
 Solución de sales minerales de
 SKEEGS y WRIGHT 5 ml
25. Etanol 95° 90 ml
 Cicloheximidina 50 mg
 Agua, q.s.p. 1 litro
 - pH : 3,5

Se trata efectivamente de un medio de cultivo del tipo del descrito anteriormente que contiene el compuesto a tratar, es decir el ácido DL-málico y, además, cicloheximidina y etanol, habiendo sido introducidos estos dos últimos compuestos a fin de evitar las contaminaciones por las levaduras y las otras bacterias. A la tasa de dilución utilizada en la experiencia no ha sido observado desarrollo de bacterias lácticas libres, por lo que el ácido málico transformado lo ha sido únicamente por las bacterias fijadas. Las medidas de decarboxilación del ácido málico en ácido láctico han sido efectuadas por el método manométrico de WARBURG bajo atmósfera de nitrógeno a la temperatura de 30°C; se recuerda que la reacción de base utilizada es la siguiente: - - - - -



Las dosificaciones enzimáticas de ácido L-láctico y de ácido L-málico se han efectuado según los métodos preconizados por BARRE (1966) y POUX (1969) utilizando el malato de deshidrogenasa de músculo de cerdo (comercializado por la firma Boehringer). La dosificación enzimática de la glucosa se ha efectuado según el método de KEILIN et al (1948) según STAUB (1963). - - - - -

Se han realizado, en paralelo, unas experiencias en las cuales los medios de cultivo eran los siguientes: - -

Medio (B)

	Zumo de tomate	10 ml
	KH_2PO_4	2 g
	Glucosa	1 g
5.	Acido DL-málico	8 g
	Solución de sales minerales de SKEEGS y WRIGHT	5 ml
	Etanol 95°	90 ml
	Cicloheximidina	50 mg
10.	Agua, q.s.p.	1 litro
	- el pH es de 3,5	

Medio (C)

	KH_2PO_4	2 g
	Glucosa	1 g
15.	Acido DL-málico	8 g
	Solución de sales minerales de SKEEGS y WRIGHT	5 ml
	Etanol 95°	90 ml
	Cicloheximidina	50 mg
20.	Agua, q.s.p.	1 litro
	- el pH es de 3,5	

El volumen útil del reactor utilizado es de 150 ml
(volumen del líquido + volumen de las partículas) y el cau-
dal de alimentación es de 38 ml/hora. - - - - -

25. Los resultados obtenidos están representados por

el gráfico de la figura 1 que representa la evolución de la concentración en ácido L-málico del efluente en función del tiempo. - - - - -

5. Se constata que en el procedimiento según la presente invención, con el medio (A) la actividad permanece constante o incluso aumenta mientras que, al cabo de 5 días con el medio (C) y de 15 días con el medio (B), la actividad resulta prácticamente nula. - - - - -

10. El aumento de actividad observado con el procedimiento según la invención es muy general. Así, en la transformación del ácido láctico, al cabo de 9 meses de utilización en continuo del reactor, la actividad de las partículas es más de 5 veces superior a la que tenía al principio de la experiencia. Este aumento de actividad ha sido medido tomando las partículas contenidas en 1 ml de solución y comprobando su actividad sobre una solución de ácido málico: - - - - -

- el 21.11.73, esta actividad es de 130 $\mu\text{l CO}_2/\text{ml.h}$
- el 13.06.74, esta actividad es de 150 $\mu\text{l CO}_2/\text{ml.h}$;

20. se trata, desde luego, del CO_2 desprendido cuando tiene lugar la reacción. - - - - -

El aumento de esta actividad puede ser explicado por el hecho de que el medio de alimentación favorece las transformaciones en un sentido siempre favorable a la reacción. - - - - -

Esto constituye una ventaja muy interesante del procedimiento según la presente invención. - - - - -

EJEMPLO 3

Transformación del ácido L-málico en ácido L-láctico

5.

Un reactor semejante al del ejemplo 2 es alimentado con una solución (A) (ver ejemplo 2) con un caudal de 38 ml/h. - - - - -

10.

Este reactor funciona desde hace 10 meses con una tasa de productividad constante de 14,4 m/M/l.h y permite la transformación de 1,9 g/l.h de ácido L-málico. Se recuerda que la tasa de productividad se calcula de la forma siguiente: - - - - -

$$T = \frac{C \times D}{V}$$

15.

C = concentración en producto del efluente para las síntesis; o la diferencia entre la concentración de producto de la alimentación y la concentración de producto del efluente para las degradaciones; - - - - -

D = caudal; - - - - -

V = volumen del líquido en el reactor. - - - - -

20.

Doblando la concentración celular cuando tiene lugar la polimerización del gel, se puede, en este caso preci-

so, doblar la productividad del reactor. - - - - -

Se ha llegado así, aumentando la cantidad de bacterias incluidas en el gel, a transformar 7 g de ácido málico/l.h a partir de la misma solución que anteriormente. - - - -

5. Este tipo de reacción sería particularmente interesante de realizar en el curso de la vinificación a fin de obtener unos vinos menos ácidos. - - - - -

EJEMPLO 4

Desnitrificación por Pseudomonas aeruginosa

10. La bacteria es cultivada en un medio "Nutrient Broth" que contiene 500 mg/l de nitrato de potasio. Después de 3 días se recoge un volumen de 2 litros que representan 1 g de bacterias en peso seco. - - - - -

15. Estas bacterias son entonces embebidas en una matriz de polímeros por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 para obtener 50 ml de partículas. Se utiliza, para la realización de la reacción, un reactor del tipo del descrito en el ejemplo 2, que tiene un volumen de 150 ml; que se alimenta con un medio que tiene la composición siguiente: - - -

- 20.
- | | |
|--|------|
| Nitrato de potasio | 2 g |
| Glucosa | 2 g |
| Fosfato monosódico | 5 g |
| Solución de sales minerales de SKEEGS y WRIGHT | 5 ml |

Como se puede constatar, a partir del séptimo día, la desnitrificación es total. - - - - -

EJEMPLO 5

Fermentación alcohólica del zumo de uva

5. La cepa utilizada en esta experiencia es una levadura Saccharomyces cerevisiae aislada en una fermentación alcohólica de vino y depositada en el I.N.R.A. de Dijon bajo el número STV III. - - - - -

10. El medio de cultivo de la levadura es una malta Wickerham que contiene 50 g/l de glucosa. Después de 48 horas se extraen las levaduras procedentes de un litro de este medio para preparar 70 ml de partículas poliméricas por el procedimiento del ejemplo 1. - - - - -

15. El fermentador está constituido por dos reactores, del tipo descrito en el ejemplo 2, en cascada, que presentan cada uno una capacidad de 250 ml. - - - - -

Este fermentador es alimentado a 80 ml/h con un zumo de uva blanca que tiene un pH de 3,1 y un contenido en azúcar de 126 g/l. - - - - -

20. Este reactor funciona desde hace un mes produciendo: - - - - -

- en el reactor 1, 0,40 mM/ml de etanol; - - - - -
- en el reactor 2, 0,85 mM/ml de etanol. - - - - -

La tasa de productividad de estos reactores es por tanto de: - - - - -

- T = 180 mM/l.h para el reactor 1;

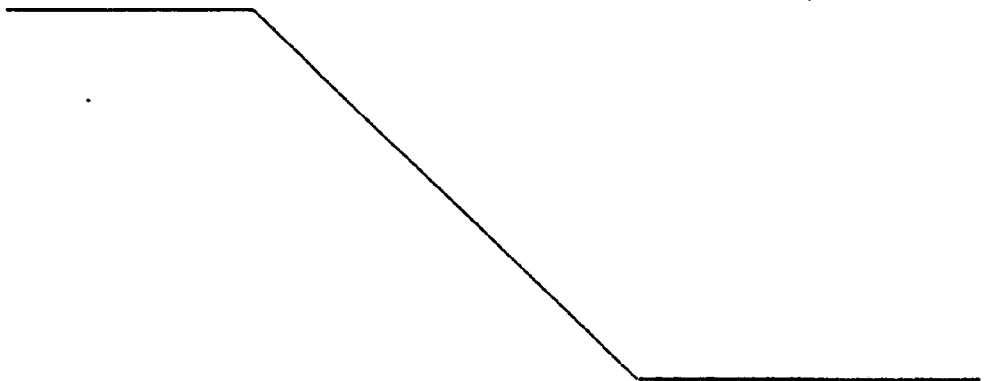
- T = 210 mM/l.h para el reactor 2. - - - - -

5. Este fermentador permite obtener 18 g/l.h de etanol. - - - - -

Ensayos comparativos con células libres en fermentación normal han demostrado que la tasa de productividad óptima es entonces de 16 mM/l.h de etanol. - - - - -

10. Es de destacar que la fermentación normal se desarrolla a 30°C mientras que la fermentación según la invención ha sido realizada a 25°C, por lo que se puede esperar mejorar aún la productividad. - - - - -

15. Se observan, además, unas diferencias notables en los productos secundarios de fermentación del procedimiento normal y del procedimiento según la invención para unos contenidos de etanol próximos. - - - - -



COMPOSICION	FERMENTACION POR LAS CELULAS LIBRES		FERMENTACION POR LAS CELULAS INCLUIDAS	
Etanol (mM/l)	472	795	388	776
Glicerol (g/l)	3,87	4,67	4,18	5,48
Alcoholes superiores (mg/l)	117	200	70	107
Propanol (mg/l)	6,26	8,15	11,3	14,1
Isobutanol (mg/l)	38,8	63	7,8	19
Alcoholes isoamílicos (mg/l)	65,5	122	17,8	40,5

Se puede pues prever razonablemente la multiplicación por 5 de la velocidad de producción de etanol. - - - -

EJEMPLO 6

Fermentación alcohólica del zumo de uvas

5. Se utilizan en este ejemplo una levadura Schizosaccharomyces pombe cultivada en las mismas condiciones que la levadura Saccharomyces cerevisiae del ejemplo 5. - - - - -

10. Se extrae 1 litro del medio de cultivo para preparar 70 ml de partículas de polímeros según el procedimiento del ejemplo 1. - - - - -

La ventaja de esta levadura es que permite no solamente la fermentación del azúcar en etanol sino también la fermentación del ácido málico en etanol. - - - - -

- Se alimenta el reactor de 250 ml con un zumo de uva blanca que contiene 126 g/l de azúcar y que tiene un pH de 3,1. Este zumo de uva contiene 12,5 mM/l de ácido málico. El caudal de alimentación es de 47 ml/h, la concentración del reactor en etanol es entonces de 600 μ M/ml y el efluente no contiene más que 1,2 mM/l de ácido málico. La tasa de productividad de este reactor es por tanto de 165 mM/l.h. -
- 5.

EJEMPLO 7

Fermentación alcohólica de melazas de remolachas

10. La cepa utilizada es una levadura Saccharomyces cerevisiae industrial que resiste al fluoruro, depositada en la entidad francesa "Asociación Interprofesional de Productos de Remolachas y de Alcoholes de Remolachas" bajo el nº CCB 248. - - - - -

15. Esta levadura es cultivada en un medio de crecimiento constituido por dos litros de malta de Wickerham que contiene 50 g/l de glucosa y 50 mg/l de NaF. Después de 48 horas de cultivo se extraen las levaduras obtenidas para preparar 70 ml de partículas polimerizadas. - - - - -

20. El reactor utilizado es semejante al del ejemplo 2 y presenta un volúmen de 250 ml. - - - - -

Se alimenta con una solución que tiene la composición siguiente: - - - - -

Melaza	286 g
Sulfato de amonio	2 g
NaF	40 mg
Agua, q.s.p.	1 litro

5.

- pH ajustado a 4,5 con ácido fosfórico.

Las tasas de productividad observadas en función del caudal son las siguientes: - - - - -

- T = 286 mM/l.h D = 47 ml/h
- T = 320 mM/l.h D = 65 ml/h.

10.

En los ejemplos presentados, las transformaciones no necesitaban una gran aireación pero el comportamiento de las partículas de acrilamida es satisfactorio en las columnas de fermentación con aire insuflado. - - - - -

15.

Los ensayos precedentes han sido realizados en reactores puesto que se producen en estas reacciones desprendimientos gaseosos (CO₂) pero desde luego, en ausencia de desprendimiento gaseoso, es preferible operar en columnas de reacción. - - - - -

20.

La presente invención permite por tanto utilizar microorganismos incluidos en unas partículas de polímeros conservando al mismo tiempo la actividad del reactor puramente enzimático. - - - - -

Este procedimiento es utilizable para la realización de reacciones enzimáticas cualesquiera tales como pro-

ducción de ácidos aminados y síntesis de antibióticos o de corticoides, por ejemplo. - - - - -

EJEMPLO 8

5. Fermentación alcohólica de mosto que sirva para la fabricación de cerveza

La cepa utilizada es una levadura Saccharomyces cerevisiae industrial depositada en la Escuela de Cervecería de Nancy bajo el nº H 59. - - - - -

10. Esta levadura es cultivada en un medio de crecimiento que contiene 2 litros de malta Wickerham que contiene 10 g/l de glucosa. - - - - -

Después de 48 horas de crecimiento, se extraen las levaduras para preparar 70 ml de partículas polimerizadas que contienen las levaduras incluidas. - - - - -

15. El reactor utilizado es idéntico al del ejemplo 2 y se mantiene a la temperatura ambiente. - - - - -

Se alimenta estérilmente con una solución de mosto de 13,74º plato y a pH 4,95. - - - - -

20. Las tasas de productividad observadas son las siguientes: - - - - -

- para un caudal de 38 ml/h: T = 167 mM/l.h

- para un caudal de 60 ml/h: T = 218 mM/l.h

La solución efluente contiene aproximadamente 80 mg/l de alcohol superior. - - - - -

EJEMPLO 9

Producción de ácido láctico

5. El microorganismo utilizado en la realización del procedimiento es una levadura Lactobacillus delbruckii ATCC 9649. - - - - -

Esta bacteria es cultivada a 40°C en el medio siguiente: - - - - -

10. Leche descremada 100 g
Extracto de levadura 5 g
Glucosa 100 g
Zumo de tomate 100 ml
Agua, q.s.p. 1000 ml
15. - pH : 7,

4 litros del medio precedente sirven para preparar 70 ml de partículas que contienen la bacteria incluida. - - - - -

El reactor utilizado es idéntico al del ejemplo 2 y su temperatura se mantiene a 45°C con termostato y es regulado a pH 5,8 por sosa 2 N. - - - - -

20.

Se alimenta este reactor con la solución siguiente:

Glucosa 100 g/l

	Extracto de levadura	20 g/l
	Solución de sales minerales de SKEEGS y WRIGHT (x)	5 ml/l
	Acetato de sodio	1 g/l
5.	K_2HPO_4	2 g/l

Para un caudal de 108 ml/l la tasa de productividad es de 21,5 g/l de ácido láctico. - - - - -

EJEMPLO 10

Desnitrificación por *Hyphomicrobium*

10. La cepa utilizada es una bacteria *Hyphomicrobium* proporcionada por el Instituto PASTEUR *Hyphomicrobium* W.C. -

La bacteria es cultivada durante 5 días en 4 litros de medio que contiene por litro: - - - - -

	KH_2PO_4	1,36 g
15.	$Na_2HPO_4, 7H_2O$	2,13 g
	$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g
	$MgSO_4, 7H_2O$	0,2 g ; $CaCl_2, 2H_2O$: 10 mg;
	$FeSO_4, 7H_2O$: 5 mg; $MnSO_4, 4H_2O$: 2,5 mg; $Na_2MoO_4, 2H_2O$: 2,5 mg;	
	KNO_3 : 5 g; metanol : 0,5 %; pH : 6,7. - - - - -	

20. Las bacterias son a continuación embebidas en una matriz de polímero por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 para obtener 30 ml de partículas. - - - - -

La ventaja de esta bacteria es que permite obtener

la desnitrificación utilizando el metanol como fuente de carbono. - - - - -

5. Se alimenta el reactor de 250 ml del ejemplo 2 con el mismo medio que el medio de cultivo exceptuando que no hay $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y que el contenido en KNO_3 es llevado a 3 g por litro. - - - - -

10. Este reactor ha funcionado durante un período de 2 meses alimentado con 40 ml/h, transformando los nitratos en nitrógeno con una productividad de 20 mg de nitrógeno producidos por litro y por hora. - - - - -

EJEMPLO 11

Transformación de leche en yogurt

15. Las cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* utilizadas son las cepas proporcionadas por los Laboratorios VISBY bajo formas liofilizadas y mantenidas durante 72 h en 3 l de medio "leche digerida a la papaina" que tiene la composición siguiente por litro: - - - - -

20. papaina 1 g, leche en polvo 30 g, glucosa 2 g, zumo de tomate 100 ml, triptona 4 g, extracto de levadura 6 g, NaH_2PO_4 6 g, pH 7 ajustado con sosa. - - - - -

Las bacterias son a continuación embebidas en una matriz de poliacrilamida (ejemplo 1) para obtener 40 ml de partículas. - - - - -

5. Se alimenta un reactor de 180 ml mantenido a temperatura de 40°C con leche reconstituida (leche en polvo + agua) cuyo caudal de alimentación está regulado por un regulador de pH cuyo punto de consigna es de pH 4,8 (a fin de que la leche no coagule en el reactor). El funcionamiento ha sido seguido en un período de 10 días, el caudal medio es de 120 ml/h y la acidez de la leche es de 83º Dornic. - - - - -

EJEMPLO 12

Depuración por digestión anaerobia

10. Los microorganismos que han servido para esta experiencia se recuperan en un digestor anaerobio de la ciudad de Dijon. Los lodos son filtrados y a continuación centrifugados para concentrar los microorganismos. Se opera como en el ejemplo precedente, colocando 170 ml de partículas embebidas en un reactor de 300 ml mantenido a 35°C y a pH 7,2. - -

20. El medio a depurar es una D.C.O. de 17.700 y tiene la composición siguiente: almidón soluble 8 g, glucosa 1 g, extracto de levaduras 3 g, peptona 4 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g, KH_2PO_4 0,57 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,5 mg, MnSO_4 10 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 ml, pH 7. - - - - -

La alimentación a 40 ml/h da a la salida una D.C.O. bruta de 5.800 y los azúcares dosificados por el método de la antrona pasan de 9,4 g/l a 0,47 g/l. Se verifica por cromatografía en fase gaseosa la producción de metano. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - -

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

5. 1.- Procedimiento de realización de reacciones enzimáticas, que utilizan microorganismos incluidos en una matriz de polímeros, caracterizado porque se alimenta en continuo un reactor que contiene los microorganismos incluidos en una matriz de polímeros con un medio de crecimiento de dichos microorganismos que contiene el o los productos a tratar y porque se extraen en continuo los productos de la reacción manteniendo los microorganismos incluidos en el reactor. - -
- 10.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la matriz de polímeros es una matriz de poliacrilamida. - - - - -
- 15.
- 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el microorganismo incluido es una bacteria o una levadura. - - - - -
- 20.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el microorganismo incluido se elige entre las bacterias de los géneros Lactobacillus y Pseudomonas. -
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caract

terizado porque el microorganismo incluido se elige entre las levaduras de los géneros Saccharomyces y Schizosaccharomyces. - - - - -

5. 6.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el microorganismo incluido se elige entre Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrückii y Pseudomonas aeruginosa. - - - - -

10. 7.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el microorganismo incluido se elige entre Saccharomyces cerevisiae y Schizosaccharomyces pombe. - - -

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el microorganismo utilizado es un mutante de poco crecimiento. - - - - -

15. 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5, 7 y 8, caracterizado por preparar alcohol etílico a partir de soluciones que contienen azúcares. - - -

10.- "PROCEDIMIENTO DE REALIZACION DE REACCIONES ENZIMATICAS". - - - - -

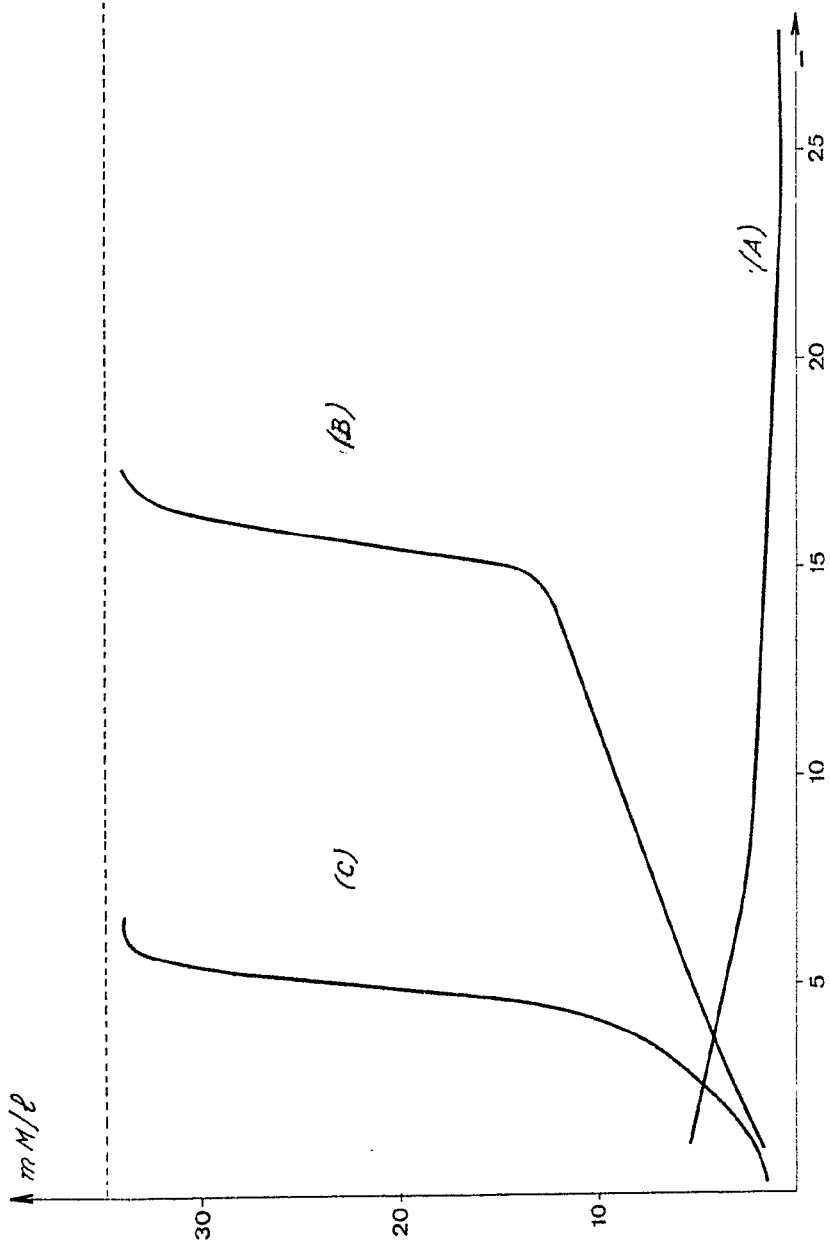
20. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veintinueve hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras, y de una lámina de dibujos que la ilustra.

MADRID - 5 AGO. 1976

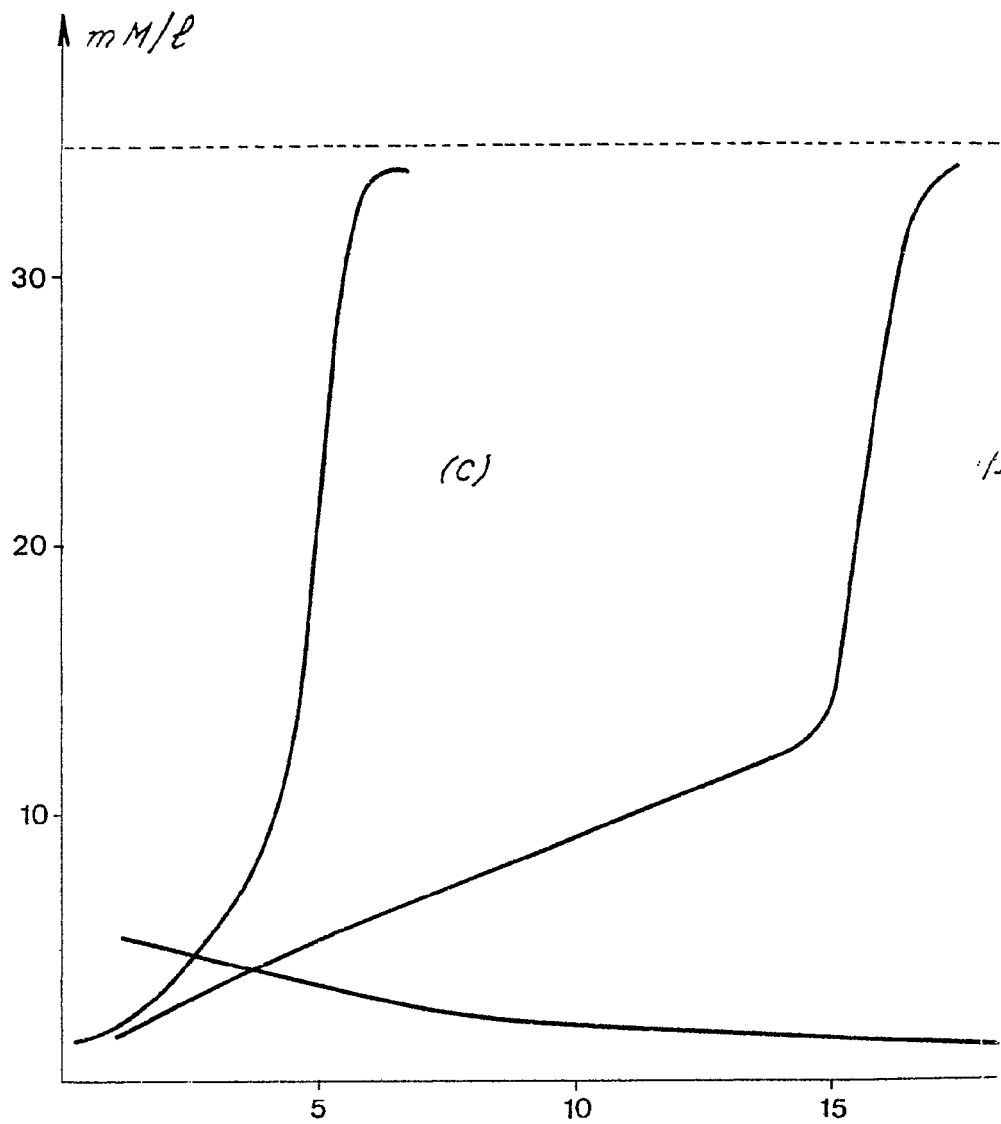
P.A. M. CURELL SUÑOL

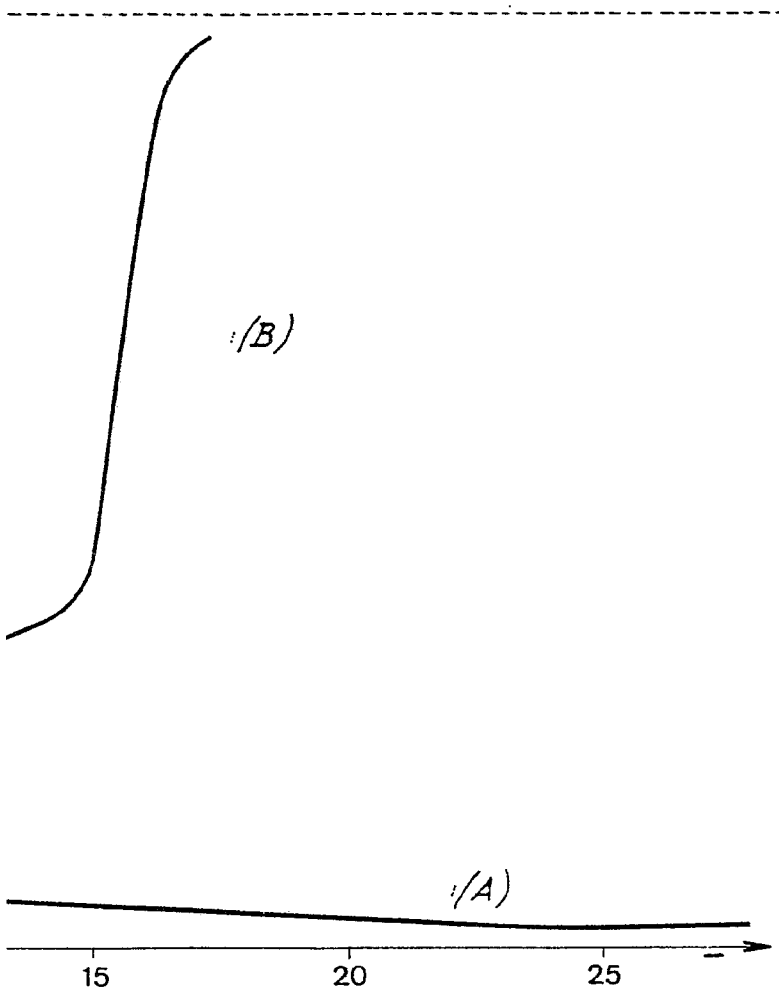
maf.





Handwritten signature and notes.





MADRID - 1974

F.A. M. CUBEL SUÑEZ