



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	475500		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			28 de Noviembre de 1978		

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

20 PRIORIDADES:		
21 NUMERO	22 FECHA	23 PAIS
		20 FEB. 1979
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"Método de obtención de proteínas y aminoácidos esenciales para la alimentación, por tratamiento electrónico de microorganismos fijadores de N ₂ "		
71 SOLICITANTE (ES)		
Consejo Superior de Investigaciones Científicas		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Serrano, 117 Madrid-6		
72 INVENTOR (ES)		
D. Antonio Martín Gonzalez		
73 TITULAR (ES)		
Consejo Superior de Investigaciones Científicas		
74 REPRESENTANTE		
D. Javier Trueba Gutierrez		

MEMORIA DESCRIPTIVA

Muchas naciones subdesarrolladas no pueden tener un mínimo nivel proteínico y ésta es la causa más importante del hambre en estos países. Estas circunstancias han llevado a la búsqueda de nuevos caminos para conseguir nuevas reservas de proteínas, como ocurre en EE.UU. que es el principal exportador de semillas oleaginosas. En Europa Occidental el 80% de las proteínas de origen animal proceden de la importación, siendo del orden del 90% en la Comunidad Económica Europea. En vista de estos datos, la Comisión de Agricultura del Mercado Común se muestra pesimista al respecto y espera que en 1980 aún seguirá importando el 90%.

Por otra parte, el coste de los fertilizantes ha aumentado enormemente en los últimos cinco años, incidiendo por consiguiente en el mayor coste de los alimentos y en la restricción del suministro dietético de los países más subdesarrollados.

También, el alto coste del proceso Haber para sintetizar amoníaco, es consecuencia de la subida del petróleo, pues el hidrógeno requerido en dicha síntesis procede del gas natural o de los crudos y requiere además una gran cantidad de energía para su combinación, por cuya razón, el coste de los fertilizantes nitrogenados está íntimamente relacionado con el coste de los combustibles.

Podemos asegurar que para la producción de proteínas es necesario conseguir ricos fertilizantes nitrogenados y que éstos, química o microbiológicamente proceden del nitrógeno atmosférico. Cerca del 25% del nitrógeno fijado es amoníaco sintetizado por el proceso Haber, el resto, que se estima en 150 millones de toneladas métricas por año, proceden de la fijación microbiana. El proceso de la fijación del N_2 , implica el consumo de una gran cantidad de energía que es suministrada por el metabolismo de los glúcidos mediante el ATP. La molécula clave en la vía de fijación del N_2 , es la nitrogenosa, que está formada por las hierro-sulfo-proteínas. El transporte de electrones --

tiene lugar a través de los dos componentes de la nitrogenasa para llegar a la completa reducción del N_2 y posterior conversión en glutamina por reacción con el glutamato y la glutaminsintetasa de la célula.

5 Todo el complejo sistema se puede resumir en una reducción del N_2 por transferencia electrónica mediante los átomos de Fe y Mo.

Este método de aplicación electrónica a cultivos de microorganismos fijadores de N_2 (Azotobacter), demuestra que es posible activar el complejo mecanismo de la asimilación del N_2 , consiguiendo aumentar en gran parte la biosíntesis de aminoácidos y dirigir su metabolismo según el tipo de onda suministrada y la frecuencia de la misma.

10 Esta activación tiene lugar mediante los iones de hierro de las ferredoxinas, puesto que el equilibrio de los iones Fe^{+2} / Fe^{+3} de los líquidos metabólicos en los cultivos de Azotobacter, es alterado en el sentido de aumentar la proporción de Fe^{+2} cuando son suministrados campos eléctricos.

15 En microorganismos que fijan N_2 no se conocen experiencias en las que sean aplicadas ondas eléctricas para estudiar sus efectos, por lo que este método proporciona nuevos caminos para el estudio de la fijación del N_2 y para la síntesis de proteínas y aminoácidos que son altamente potenciados según el tipo de onda eléctrica, potencial, intensidad y frecuencia de la misma.

20 El rendimiento de obtención de proteínas y aminoácidos por microorganismos que fijan N_2 con este método electrónico puede ser aumentado al ir estudiando todas las constantes eléctricas en los puntos en que influyen más favorablemente en la biosíntesis de aminoácidos.

25 Utilizando, únicamente melazas de remolachas al 2% como sustrato y aplicando ondas cuadradas de 62 mA, 20 Hz y 7 V en fermentadores de 4 litros de medio, es posible conseguir células de Azotobacter vinelandii (208 CECT) que contienen un - 56,3% de aminoácidos, siendo destacable por su importancia en la alimentación la proporción de metionina (6,57%), lisina (4,85%) y otros aminoácidos esenciales, que por la acción de los campos eléctricos aplicados, fueron potenciados con relación a los fermentadores testigo, 13,41 veces más en la concentración de metionina, 4,90 veces en la tirosina, 1,92 en la alanina y un 60% más en el total de todos los aminoácidos analizados.

Empleando sacarosa al 1,5% como sustrato con la estirpe Azotobacter vinelandii (382 DSM), y aplicando ondas sinusoidales de 5 V, 7 mA y 20 Hz en matraces con 100 ml de medio de cultivo conseguimos aumentar en un 258% el contenido en peso de todos los aminoácidos del líquido metabólico, destacando la arginina que fué potenciada 11,67 veces, el ácido glutámico 5,6 veces, la treonina 4,77 veces, la leucina 4,14, la serina 4,16, el ácido aspártico 3,36, la glicina 3,18, valina 3,27, la lisina 3,03, la tirosina 3,13, la fenilalanina 2,99, la isoleucina 2,90 y la alanina 2,53.

Aplicando ondas sinusoidales de 5 V, 7 mA, y 200.000 Hz, lo más destacable es la valina que es potenciada 10 veces más que en los cultivos testigo. Los campos eléctricos suministrados evitan la glucogénesis de los aminoácidos glucogénicos impidiendo su degradación en los cultivos de Azotobacter. En la aplicación de los cultivos como alimento, tanto las células como los líquidos metabólicos son perfectamente tolerados por los organismos, siendo muy grande su poder nutritivo.

Procedimiento

Para la obtención de proteínas y aminoácidos esenciales para la alimentación a partir del nitrógeno atmosférico, empleamos nueve estirpes diferentes de Azotobacter, de ellas cinco de A.chroococcum (203, 204, 205, 206 y 374 CECT), dos de A.vinelandii (208 CECT y 382 DSM), una de A.agile (210 CECT) y una de A.beijerinckia (181 CECT).

La elección de las estirpes estudiadas se hizo comparando sus coeficientes de crecimiento, siendo elegida la estirpe 208 CECT de Azotobacter vinelandii cuando el sustrato usado era la melaza de remolacha al 2% y la estirpe 382 DSM de A. vinelandii cuando se utilizaron las siguientes fuentes de carbono: ácido benzoico al 1%, sacarosa al 1,5%, acetato sódico al 0,5% y etanol al 1%. La composición del medio de cultivo era en g/l, K_2HPO_4 , 0,4; KH_2PO_4 , 0,1; Na_2MoO_4 , 0,001; $FeCl_3$, 0,003 y 2% de melaza de remolacha. Cuando usabamos las otras fuentes de carbono la concentración de K_2HPO_4 era de 0,64 g/l y el KH_2PO_4 de 0,16 g/l.

El sistema de aplicación de los campos electricos en los cultivos, fué realizado empleando electrodos de platino, colocados en los extremos de un matraz redondo de tres bocas de 250 ml de capacidad, con 100 ml de medio mencionado anteriormente.

La superficie de los electrodos sumergida en el líquido metabólico era la correspondiente a un hilo de platino de 5 cm de longitud y 0,40 mm de diámetro.

5 Cuando aplicábamos los campos electricos en un fermentador de 5 litros de capacidad con 4 litros de medio de cultivo, instalamos electrodos de platino con una superficie sumergida de 10 x 0,5 cm.

Las ondas eléctricas suministradas a los cultivos procedían de un generador modelo Exact de un rango de frecuencias de 0 a 2 MHz, siendo las frecuencias - 5 Hz y 200 KHz de ondas sinusoidales aplicadas en los cultivos de Azotobacter, los puntos óptimos en la activación del proceso reproductivo de las células.

10 La temperatura de todos los cultivos fué de 28°C durante todo el tiempo de incubación. Pasamos un caudal de aire estéril, saturado de humedad, de 150 litros /horas a una presión de 1 Kg/cm², cuando los cultivos fueron incubados en un fermentador de 5 litros de capacidad con 4 litros de medio de cultivo y los matraces de 250 ml, con 100 ml de medio se incubaron en un incubador orbital (Controlled Environment Incubator Shaker N.B.S.) a 170 r.p.m. y 28°C.

REIVINDICACIONES

20 Se reivindica como de nueva y propia invención la propiedad y explotación exclusiva de:

1) "METODO DE OBTENCION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS - ESENCIALES PARA LA ALIMENTACION, POR TRATAMIENTO ELECTRONICO DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE N₂", caracterizado porque a un cultivo de microorganismos fijadores de N₂, se le aplica un campo electrico de ondas sinusoidales y - 25 ondas cuadradas, cuyo rango de frecuencia oscila entre 0 y 2 MHz consiguiéndose un elevado aumento en el contenido en peso de casi todos los aminoácidos del líquido metabólico.

2) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado por el empleo de nueve estirpes de Azotobacter como microorganismo fijador de N₂.

30 3) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado porque el microorganismo empleado es Azotobacter vinelandii 208 CECT y la composición del medio de cultivo es (g/l) K₂HPO₄, 0,4; KH₂PO₄, 0,1; Na₂MoO₄, 0,001; FeCl₃, 0,003

y 2% de melaza de remolacha.

4) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado porque el microorganismo empleado es Azotobacter vinelandii 382 DSM y como fuente de carbono se emplea ácido benzóico al 1%.

5) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado porque el microorganismo empleado es Azotobacter vinelandii 382 DSM y la fuente de carbono es sacarosa al 1,5%.

6) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado por el empleo de Azotobacter vinelandii 382 DSM y acetato sódico al 0,5% como fuente de carbono.

7) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado por el empleo de Azotobacter vinelandii 382 DSM y etanol al 1%.

8) Un método, según reivindicaciones 1,4,5,6 y 7, y caracterizado porque el cultivo tiene una concentración de K_2HPO_4 de 0,64 g/l y de KH_2PO_4 de 0,16 g/l.

9) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado por el empleo de las siguientes estirpes de Azotobacter: Azotobacter chroococcum, 203, 204, 205, 206 y 374 CECT; Azotobacter agile 210 CECT y Azotobacter beijerinckia 181 CECT.

10) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado porque la frecuencia eléctrica empleada varía de 5 Hz a 200 KHz.

11) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado porque la temperatura del cultivo es de 28°C.

12) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado porque el campo eléctrico se aplica mediante la introducción de unos electrodos de platino en el líquido metabólico.

13) "METODO DE OBTENCION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS ESENCIALES PARA LA ALIMENTACION, POR TRATAMIENTO ELECTRONICO DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE N_2 ", tal y como se describe en el cuerpo de esta

memoria y reivindicaciones que consta de 7 páginas escritas por una sola cara.

Jose L. L...