



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 319 468**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 1/00 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **95907047 .5**

(96) Fecha de presentación : **18.01.1995**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0737246**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.1996**

(54)

Título: **Cepas bacterianas del género *Bacillus*, fenotípicamente próximas al género *Lactobacillus*, procedimiento de cultivo y aplicaciones.**

(30)

Prioridad: **18.01.1994 FR 94 00485**

(73)

Titular/es: **Institut de Recherche pour le
Développement (IRD)
213, rue La Fayette
75010 Paris, FR**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2009

(72)

Inventor/es: **Combet-Blanc, Yannick;
Ollivier, Bernard y
Garcia, Jean-Louis**

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2009

(74)

Agente: **Ruo, Alessandro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas bacterianas del género *Bacillus*, fenotípicamente próximas al género *Lactobacillus*, procedimiento de cultivo y aplicaciones.

La invención tiene por objeto cepas bacterianas fenotípicamente próximas al género *Lactobacillus*.

Se dirige igualmente a procedimientos de cultivo de estas cepas así como a sus aplicaciones industriales.

La invención se refiere más en particular a cepas bacterianas como las aisladas a partir de vino de palma.

Se sabe que el vino de palma es una bebida alcohólica que proviene de la fermentación espontánea de la savia de árboles pertenecientes a la familia de las palmeras. Esta savia contiene aproximadamente del 10 al 15% (p/v) de sacarosa, numerosos aminoácidos y vitaminas.

Los estudios microbiológicos efectuados han demostrado la presencia de una abundante flora mesófila constituida por numerosas especies de bacterias y levaduras.

Así, en J. Apl. Bact., 1975, 28, 81-88, M. Okafor describe bacterias aisladas de muestras de vino de palma.

El estudio por los autores de la invención de la flora anaerobia termófila presente en un vino de palma que proviene de Senegal los ha llevado a aislar una cepa no identificada hasta la actualidad que presenta propiedades de gran interés en diversos campos de la industria.

La invención tiene, por tanto, por objetivo suministrar nuevas cepas de este tipo.

Se dirige igualmente a suministrar protocolos de cultivo de estas cepas que precisan las condiciones fisicoquímicas y la composición del medio de cultivo que permiten producir favorablemente células y/o ciertos metabolitos como, por ejemplo, L(+)-lactato.

Según otro aspecto, la invención se dirige al uso directo de estas cepas o al de sus metabolitos en diversas industrias.

La invención se dirige en particular a la cepa bacteriana depositada en la C.N.C.M. el 24 de noviembre de 1993 con el nº I-1378 y las cepas de la misma especie que poseen una catalasa, que tienen una temperatura de crecimiento de 25°C a 58,5°C con una temperatura de crecimiento óptima de 47°C a 53°C, que poseen propiedades amilolíticas y/o capaces de producir L(+)-lactato como producto de fermentación.

La referencia de identificación de esta cepa es DKP. Como nombre de designación taxonómica, se usará *Bacillus thermoamilovorans* gen. nov. sp. nov., siendo la designación previa *Lactobacter thermoamilovorans* gen. nov. sp. nov.

De manera ventajosa, al menos el 70% del genoma de las cepas de la invención es capaz de hibridarse con ADN de la cepa depositada.

Según otro aspecto, estas cepas se caracterizan porque son moderadamente termófilas, poseen propiedades amilolíticas y/o son capaces de producir lactato a partir de hidratos de carbono. Se observará que, de manera ventajosa, el lactato producido es de más del 95% de L(+)-lactato.

Por la expresión “moderadamente termófila”, se entiende cepas bacterianas capaces de crecer a temperaturas del orden de 25 a 58,5°C, con un valor óptimo que se sitúa entre 47 y 53°C.

La invención se dirige más en particular a cepas del género *Bacillus* como se demuestra por comparación de las secuencias del ARN de la fracción 16 S de los ribosomas.

Las cepas de este tipo se caracterizan además porque son heterolácticas, es decir, son capaces, a partir de hidratos de carbono, de producir compuestos distintos del L(+)-lactato, sobre todo etanol, formiato y acetato, según las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo, en particular según el pH, y la relación azúcares/péptidos.

Estas cepas se caracterizan además porque no poseen citocromo y no son capaces de usar los nitratos o los sulfatos como aceptor terminal de electrones. Poseen una catalasa y su metabolismo es anaerobio facultativo.

Según otra disposición de la invención, estas cepas se caracterizan por condiciones de crecimiento anaerobias y propiedades de microaerofilia, es decir, que bajas presiones parciales de oxígeno estimulan su crecimiento.

Su crecimiento se efectúa más especialmente a un pH de 5,4 a 8,5, con un valor óptimo para el crecimiento de 6,5 a 7,5 aproximadamente.

Las cepas bacterianas de la invención se caracterizan además porque son Gram positivas.

ES 2 319 468 T3

Según otra disposición de la invención, las cepas bacterianas se caracterizan por células no esporuladas, aisladas o en pequeñas cadenas de 3 o 4 células, que tienen la forma de bastones con flagelos peritricos.

Según otra disposición más, el contenido del ADN de las cepas bacterianas de la invención en guanina más citosina es inferior al 50% en moles, en particular del orden del 40% en moles.

Los mutantes de las cepas que responden a las definiciones que preceden entran igualmente en el marco de la invención desde el momento en que conservan al menos el 70% de capacidad de hibridación con el ADN de la cepa depositada.

De acuerdo con la invención, las cepas bacterianas definidas anteriormente se obtienen por cultivo en condiciones anaerobias, o como mínimo con baja presión parcial de oxígeno, a un pH de 5,4 a 8,5 aproximadamente, en un medio de base que contiene un azúcar utilizable por estas cepas como fuente de energía y péptidos como fuente de nitrógeno, a una temperatura de 25 a 58,5°C.

Por cultivo con baja presión parcial de oxígeno, se entiende un cultivo efectuado, por ejemplo, en medio líquido con aire por encima.

Se efectúa ventajosamente el cultivo a un pH de 6,8 a 7,2 y a una temperatura de 47 a 53°C.

En condiciones óptimas de pH y de temperatura, el tiempo de duplicación de la biomasa es de 40 a 45 minutos aproximadamente.

Para el crecimiento de las cepas, se usan principalmente hidratos de carbono, más en particular glucosa, como compuestos de fuente de carbono y de energía, péptidos como fuente de nitrógeno y factores de crecimiento.

Los péptidos y los factores de crecimiento están presentes, por ejemplo, en extractos de levadura e hidrolizados tripsicos de caseína o de gelatina.

La adición de vitaminas permite acelerar el crecimiento pero no es indispensable.

Esto se favorece en particular cuando se añade al medio de cultivo un hidrolizado de caseína como el obtenido por acción de la tripsina, como el denominado a menudo Biotryptase^R o extractos de levadura.

Las colonias bacterianas formadas después de aproximadamente 48 h de cultivo en las condiciones dadas anteriormente se recuperan de forma aislada en medio líquido con el fin de obtener cultivos puros.

En la descripción precedente se han indicado diferentes propiedades de las cepas de la invención. Estas propiedades encuentran aplicaciones en campos muy variados.

Así estas cepas, gracias a sus propiedades termófilas y amilolíticas, que se ejercen igualmente en medios muy diluidos, se añaden ventajosamente a los efluentes industriales con fines de descontaminación.

La invención se dirige así a un procedimiento de tratamiento de efluentes industriales con fines de descontaminación, caracterizado porque comprende una implementación de cepas bacterianas como las definidas anteriormente.

La proximidad filogenética de las cepas de la invención con las especies pertenecientes al género *Bacillus*, así como las similitudes fisiológicas con las bacterias lácticas, se aprovechan ventajosamente en procedimientos de fermentación alimentaria. Sus propiedades de fermentación y enzimáticas permiten sustituirlas ventajosamente y/o completar las atribuidas a las bacterias lácticas y a los Bacilli.

Estas cepas presentan igualmente un gran interés para elaborar mutantes por transferencia de material genético entre estas cepas, las bacterias lácticas y los bacilos, lo que permite acumular un conjunto de propiedades comunes a estas bacterias.

Los caracteres termófilo moderado, anaerobio facultativo y neutrófilo de las cepas de la invención presentan igualmente un gran interés con vistas a una explotación en cultivo puro. En efecto, la posibilidad de cultivarlas a una temperatura que vaya hasta 58,5°C permite limitar las fuentes de contaminación por otros microorganismos, acelerar las cinéticas del metabolismo celular y aumentar la solubilidad de los componentes del medio de cultivo. Además, a esta temperatura la baja concentración de oxígeno disuelto no inhibe, sino que estimula, el crecimiento de estas cepas anaerobias facultativas, lo que facilita enormemente la implementación de los cultivos evitando todas las restricciones técnicas ligadas a la anaerobiosis. El carácter neutrófilo de las cepas, apreciable con respecto a la acidofilia de las bacterias lácticas, permite evitar los problemas de corrosiones y prolongar la vida útil de las instalaciones.

La capacidad de las cepas de la invención de fermentar una gran variedad de azúcares, sobre todo almidón, lactosa y sacarosa, es una baza importante. Estos tres azúcares potencialmente utilizables como sustratos energéticos están, en efecto, disponibles en diferentes formas en gran cantidad.

ES 2 319 468 T3

La posibilidad de actuar sobre el metabolismo de estas cepas controlando los parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo (pH, relación azúcares/péptidos) alarga su campo de aplicación. Así, es posible, por ejemplo, orientar la fermentación hacia la producción de células y de metabolitos celulares como enzimas. Es posible igualmente orientar el metabolismo energético de la cepa favoreciendo bien la producción de lactato, o bien la producción de acetato, etanol y formiato.

La invención se dirige así igualmente a un procedimiento de producción de metabolitos como L(+)-lactato, acetato, formiato, etanol, caracterizado porque comprende

- el cultivo de una cepa bacteriana como la definida anteriormente, en condiciones apropiadas para su desarrollo y para la producción del metabolito buscado,
- la recuperación de los metabolitos producidos, seguido del aislamiento del metabolito deseado y su purificación.

El ácido láctico producido por las cepas de la invención es de un gran interés porque está constituido en más del 95% por L(+)-lactato que es asimilable por los organismos superiores mientras que el D(-)-lactato presenta un carácter de toxicidad.

Se le separa del cultivo, y se concentra, por ejemplo, por evaporación, llegado el caso hasta sequedad.

Los concentrados o productos secos se usan tal cual o se tratan para formar derivados deseados del ácido láctico.

Se sabe que las aplicaciones del ácido láctico o de sus ésteres y otros derivados son muy amplias.

El ácido láctico se usa así en la industria agroalimentaria incorporándolo en bebidas, cervezas, productos lácticos como nata, queso, mantequilla, helados o incluso mermeladas.

Como tensioactivo, se usará con ventaja en panificación y bollería en forma, por ejemplo, de lactil mono- y diglicéridos y de esteraril-lactilato de sodio.

En la industria farmacéutica, el lactato de potasio puede constituir un sustituto del cloruro de sodio, en particular muy valioso en los casos de hipertensión.

Se usa también para sus propiedades de agente complejante, sobre todo con el hierro y el calcio para tratar las carencias.

Finalmente, entre las aplicaciones del ácido láctico, de sus sales y derivados en la industria química, se citará su uso en la elaboración de resinas plásticas, adhesivos, pesticidas, materiales textiles, o incluso en pinturas, diluyentes y disolventes, o para el tratamiento de superficie de metales.

Se subrayará su gran interés en la química de los polímeros en la que sirve para fabricar polilactidas y/o copolímeros con, por ejemplo, óxidos de polialquileño, alcoholes polivalentes, ácido glicólico, ácidos hidroxicarboxílicos, copolímeros de etileno y de propileno, cauchos butílicos o elastómeros de poliuretano termoplásticos. A partir de estos polímeros y/o copolímeros, pueden fabricarse diversos artículos, en particular para el embalaje, películas de usos médicos para realizar apósitos o incluso materiales de envoltura para suturas quirúrgicas.

El medio de cultivo preconizado para el uso industrial de las cepas de la invención con vistas a la producción de L(+)-lactato presenta el interés de tener un coste menor que el usado habitualmente para las bacterias lácticas, debido a los precios del extracto de levadura o del "corn steep liquor" que contiene los factores de crecimiento indispensables para estas bacterias. En efecto, al ser las bacterias lácticas muy exigentes en factores de crecimiento, se recomienda para una buena productividad en ácido láctico usar un medio cuya relación azúcar/factores de crecimiento sea de 1 mientras que para las cepas de la invención esta relación debe ser de 2.

Se refieren otras características y ventajas de la invención en la descripción que sigue dada a modo de ejemplo, que se refiere a la cepa mencionada anteriormente, denominada cepa DKP, depositada en la C.N.C.M. con el n° I-1378.

Se hará referencia a las figuras 1 a 3 que representan fotografías de células de esta bacteria al microscopio óptico (figura 1) y al microscopio electrónico, con un aumento de 20.000 en la figura 2 y de 80.000 en la figura 3.

ES 2 319 468 T3

a. *Procedimiento de enriquecimiento y aislamiento de las cepas*

. *Medios y procedimientos de cultivo*

5 Se usa el medio de cultivo siguiente:

	Glucosa	10 g
10	Extracto de levadura	5 g
	Biotrypcase	5 g
15	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,4 g
	NH ₄ Cl	1 g
20	FeSO ₄ , 7H ₂ O	5 mg
	Solución mineral de Balch (más abajo)	25 ml
25	Solución de oligoelementos de Balch (más abajo)	1 ml
	Tween 80	1 ml
30	H ₂ O destilada q.s.p.	1.000 ml

35 Las composiciones de la solución mineral de Balch y de la solución de oligoelementos de Balch son las siguientes:

Solución mineral de Balch

	KH ₂ PO ₄	6 g
40	(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g
	NaCl	12 g
45	MgSO ₄ , 7H ₂ O	2,6 g
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,16 g
50	H ₂ O destilada q.s.p.	1.000 ml

55

60

65

ES 2 319 468 T3

Solución de oligoelementos de Balch

5	Ácido nitriloacético	1,5 g
	MnSO ₄ , 2H ₂ O	0,5 g
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	3 g
10	NaCl	1 g
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
15	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,1 g
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1 g
	ZnCl ₂	0,1 g
20	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,01 g
	AlK(SO ₄) ₂	0.01 g
25	H ₃ BO ₃	0,01 g
	Na ₂ MoO ₄	0,01 g
30	H ₂ O destilada q.s.p.	1.000 ml

El pH del medio de cultivo se ajusta a pH 7,5 con KOH 10 M antes de esterilización.

El medio se lleva a continuación a ebullición, y después se enfría y se reparte en una corriente de nitrógeno

- en frascos de tipo penicilina o frascos de suero a razón de 20 ml por frasco
- en tubos de Hungate, a razón de 10 ml por tubo, y
- en tubos de Hungate que contienen 4,5 ml de medio al 3,5% de agar por tubo.

Después de tratamiento en el autoclave a 110°C durante 45 min, se añade:

- 1 ml de NaHCO₃ al 10% + 0,2 ml de Na₂S, 9H₂O al 2% en los frascos de suero,
- 0,5 ml de NaHCO₃ al 10% + 0,1 ml de Na₂S, 9H₂O al 2% en los tubos de Hungate a 10 ml, y
- 0,25 ml de NaHCO₃ al 10% + 0,05 ml de Na₂S, 9H₂O al 2% en los tubos de Hungate que contienen agar.

Las soluciones de NaHCO₃ y de Na₂S usadas son estériles.

Los medios, líquidos en los dos primeros casos, sólido en el último caso, están listos para ser inoculados.

. Procedimiento de enriquecimiento

Se someten a incubación a una temperatura de 50°C frascos que contienen medio de cultivo preparado anaeróbi-
camente según se define anteriormente y se inoculan con muestras de vino de palma. Después de varios trasplantes, la
flora anaerobia y termófila inicialmente presente en el vino de palma se hace dominante.

Procedimiento de aislamiento mediante la técnica de tubos rotatorios según el procedimiento de Hungate y Macy
(1) y (2):

- Preparación de tubos rotatorios

Los tubos de Hungate se calientan a 90°C con fines de fusión del medio sólido. A continuación se enfrían a 50°C
con mantenimiento del agar en fusión.

ES 2 319 468 T3

Se inocula con el medio de enriquecimiento final según se obtiene anteriormente a razón de 0,5 ml en cada tubo.

La gelosa en fusión se distribuye, por centrifugación, en la pared del tubo y se solidifica por enfriamiento.

5 - *Aislamiento*

Después de 48 h de incubación a 50°C de los tubos rotatorios, cada colonia se vuelve a suspender y se diluye en cascada en una serie de tubos de Hungate que contienen un medio líquido.

10 Los tubos se incuban a 50°C durante 24 horas.

Se inocula a continuación un frasco suero que contiene medio líquido a partir de la última dilución que muestra un crecimiento y se somete el frasco a incubación a 50°C durante 24 horas.

15 Se verifica al microscopio óptico que todas las células son idénticas.

El procedimiento de aislamiento se repite al menos una vez verificando que todas las colonias presentan características idénticas.

20 El cultivo resultante es puro.

b. *Descripción de la cepa*

. *Caracteres morfológicos*

25 Después de 48 horas de incubación de los tubos rotatorios, la cepa obtenida denominada cepa DKP se presenta en forma de colonias blancas y lisas con un diámetro de 1 a 1,5 mm. Las células no esporuladas, aisladas o en pequeña cadena de 3 a 4 células (véase fotografía 1), tienen la forma de bastones de 0,35 a 0,4 μm de diámetro y de 3 a 4 μm de longitud que poseen flagelos peritricos (véase fotografía 2). La pared celular presenta las características de las bacterias Gram positivas (véase fotografía 3).

. *Caracteres bioquímicos y propiedades metabólicas*

- *Elementos del medio*

35 En un medio que contiene hidratos de carbono, sobre todo glucosa como fuente de energía, se añadirán ventajosamente péptidos, por ejemplo extractos de levadura, para favorecer el crecimiento. No se observa ningún crecimiento cuando se usa gelatina o caseína en lugar del extracto de levadura. Pero se constata un débil crecimiento cuando se añaden aminoácidos en lugar del extracto de levadura.

- *Condiciones de crecimiento y propiedades metabólicas*

40 El crecimiento se efectúa en condiciones anaerobias o como mínimo con una baja presión parcial de oxígeno. Las colonias no se observan siempre en placas de Petri incubadas en aerobiosis. Las células poseen una catalasa, pero no citocromos. NO_3^- y $\text{SO}_4^{=}$ no se reducen y no se observa ninguna producción de indol, de H_2S y de H_2 . En un medio con arginina como fuente de energía, se produce NH_3 pero no se observa ningún crecimiento.

Los valores de pH para el crecimiento son de 5,4 a 8,5 con un valor óptimo en 7,0.

50 La temperatura óptima para el crecimiento se sitúa aproximadamente a 50°C, siendo 58,5°C la temperatura límite superior.

En un medio que contiene extracto de levadura y glucosa como fuentes de energía, a un pH de 7,0 y a una temperatura de 50°C, el tiempo de duplicación máximo de la biomasa es de 40 a 45 min.

55 Los productos de la fermentación de la glucosa son acetato, etanol, formiato y lactato. El lactato producido es un L(+)-lactato al 96%. Las proporciones molares en acetato, etanol y formiato son del orden respectivamente de 1:1:2 mientras que la proporción de lactato con respecto a estos tres productos varía según las condiciones de cultivo (pH y relación glucosa/péptidos).

- *Azúcares fermentables*

60 Los azúcares siguientes se fermentan en 24 horas: L-arabinosa, ribosa, D-glucosa, D-fructosa, D-mannosa, ramnosa, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, trehalosa, almidón, glucógeno, β -gentiobiosa y gluconato.

Se observa una fermentación más lenta de 48 a 96 h con D-xilosa, galactosa, N-acetil-D-glucosamina, lactosa, sacarosa, melecitosa y D-turanosa.

ES 2 319 468 T3

No se observa ninguna fermentación para glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adonitol, L-sorbose, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, un metil-D-mannósido, un metil-D-glucósido, melibiosa, inulina, D-rafinosa, xilitol, D-lixosa, D-tagatosa, D y L-fucosa, D-arabitol y L-arabitol.

- Necesidades de vitaminas

Se observa una estimulación del crecimiento de la cepa bacteriana con tiamina, D, L-biotina, las bases purínicas y pirimidínicas. Por el contrario, no aparece ningún efecto significativo con vitamina B12, piridoxina, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, Ca-D-pantotenato, ácido fólico y riboflavina. Caracteres genéticos:

La cepa DKP se caracteriza por un contenido en guanina + citosina, determinado por HPLC según el procedimiento de Meshbah y col. (3), del $38,8 \pm 0,2\%$.

c. Técnicas de análisis

El crecimiento bacteriano se controla midiendo el aumento de la turbidez a 600 nm en tubos de Hungate para cultivos anaerobios con un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A.

El perfil de fermentación se determina usando el medio de base al que se añade de forma estéril hidrato de carbono probado hasta una concentración final del 0,3% (p/v) y el 0,017% de azul de bromotimol. Para cada hidrato de carbono, esterilizado por separado por filtración, se efectúan dos cultivos en doubles sucesivos.

Las necesidades de vitaminas se determinan usando un medio químicamente desprovisto de vitaminas, suplementado con glucosa hasta una concentración final del 0,3% (p/v).

Las vitaminas y bases purínicas y pirimidínicas se añaden de forma estéril a una concentración final: ácido nicotínico, HCl de tianina, Ca-D-pantotenato, riboflavina, 992 $\mu\text{g/l}$; ácido p-aminobenzoico, 551 $\mu\text{g/l}$; piridoxina, 1.984 $\mu\text{g/l}$; vitamina B12, 1 $\mu\text{g/l}$; DL biotina, 10 $\mu\text{g/l}$; ácido fólico, 1 $\mu\text{g/l}$; adenina, guanina, uracilo, xantina, 5.157 $\mu\text{g/l}$. Para las inoculaciones, se usan suspensiones de bacterias que se han lavado dos veces en agua fisiológica al 9‰ de NaCl estéril. Para cada vitamina, se efectúan tres cultivos sucesivos.

Las formas de resistencia (esporas) se han buscado por observación al microscopio y por puesta en cultivo de la cepa después de pasterización a 80°C durante 20 minutos.

El intervalo de temperatura para el crecimiento se ha definido en cultivos en tubo incubados en baños maría regulados a diferentes temperaturas.

La actividad catalasa se ensaya con una solución al 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno. La producción de indol y de amonio se determina respectivamente con los reactivos de Kovacs y de Nessler. Para revelar la reducción de nitratos, se usa el reactivo de Griess.

H₂S se mide mediante fotometría como coloide CuS, después de reacción con una mezcla que contiene 50 mM de HCl y 5 mM de CuSO₄.

La glucosa, el lactato, el acetato, el etanol y el formiato se determinan en muestras diluidas por HPLC usando una bomba Analprep 93 y una columna de tipo ORH 801. Se usa una velocidad de 0,6 ml/min, un volumen de bucle de inyección de 20 μl , una temperatura de columna de 35°C. El detector usado es un refractómetro diferencial (Knauer, Berlín, RFA).

La cantidad de hidrógeno se determina con ayuda de un cromatógrafo gaseoso Girdel serie 30, equipado con un detector de conductividad térmica. La columna se llena con Carbosphere SS (malla 60/80).

Se usan deshidrogenasas L(+)-láctica y D(-)-láctica para determinar las formas estereoisómeras del ácido láctico producido por la fermentación de la glucosa (kits enzimáticos Boehringer Mannheim).

Para el análisis de los citocromos, se someten 3 g de células a un tratamiento de sonicación en 10 ml de tampón Tris clorhidrato 20 mM (pH 7,6); la suspensión de células rotas se centrifuga a 30.000 g durante 45 min a 5°C para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante resultante se separa en un sobrenadante y una fracción de partículas por centrifugación a 140.000 g durante 2 h. El sobrenadante se toma como fracción soluble. El fondo gelatinoso negro se pone en suspensión de la misma forma y representa la fracción de partículas. El examen para los citocromos de los extractos desprovistos de células se realiza con ayuda de un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV 300.

ES 2 319 468 T3

d. Procedimientos de cultivo y aplicaciones

1. Producción de biomasa

5 Para la producción de biomasa, se usan dos técnicas de cultivo:

1- En medio no renovado

10 La fermentación se regula a un pH de 7 con ayuda de una solución alcalina (por ejemplo, sosa) y a una temperatura de 50°C. Se usa un medio de cultivo que responde a la composición siguiente:

	- Glucosa	a calcular
	- Extracto de levadura/hidrolizado de proteínas	a calcular
15	- NH ₄ Cl	3 g/l
	- KH ₂ PO ₄	3 g/l
20	- MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4 g/l
	- FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg/l
25	- Tween 80	5 g/l

La concentración de glucosa y de factores de crecimiento es función de la concentración de células que se desea obtener. Para estimar la concentración de biomasa en fin de fermentación, puede usarse la relación siguiente:

$$30 \quad 1 / X = 2,07 / F + 3,78 / G$$

. X concentración celular en g/l (peso en seco de células por litro)

35 . G concentración de glucosa en g/l

. F Factores de crecimiento contenidos en una mezcla constituida por el 50% de extracto de levadura y el 50% de un hidrolizado de proteína (por ejemplo, caseína hidrolizada por tripsina), siendo F la concentración en g/l de la mezcla.

40 La relación anterior se ha verificado para una gama de concentración de glucosa y de factores de crecimiento que van respectivamente de 5 a 60 g/l y 1 a 30 g/l.

45 A modo de ejemplo, para obtener 7,6 g de células (peso en seco), se usan 60 g de glucosa y 30 g de factores de crecimiento. En las condiciones operativas descritas precedentemente, la fermentación dura aproximadamente de 7 a 9 horas, la concentración final en ácido láctico representa aproximadamente el 40% en peso de los productos finales y la productividad en células es de 1 g/l·h.

2- En medio renovado

50 El cultivo se regula a un pH de 7 y a una temperatura de 50°C. El fermentador se alimenta en continuo con el medio de cultivo precedente cuyas concentraciones de factores de crecimiento (F) y de glucosa son dependientes de la concentración de células que se desea obtener. Para producir la biomasa, se recomienda elegir una tasa de dilución de 1 h⁻¹ con, como factor nutricional que limita el crecimiento, la fuente de energía (glucosa u otros hidratos de carbono). Tomando la glucosa como fuente de energía, convendrá elegir una relación glucosa/F de aproximadamente 0,75.

55 Para calcular las concentraciones de factores de crecimiento (F) y de glucosa se usarán las dos demandas específicas siguientes.

$$60 \quad q F = 6,6 \text{ g/g} \cdot \text{h}$$

$$q G = 3,5 \text{ g/g} \cdot \text{h}$$

65 . q F demanda específica de factores de crecimiento expresada en g por g de células (peso en seco) y por hora.

. q G demanda específica de glucosa expresada en g de glucosa por g de células (peso en seco).

ES 2 319 468 T3

A modo de ejemplo, usando un medio de cultivo cuyas concentraciones de glucosa y de factores de crecimiento son respectivamente 20 y 40 g/l y fijando la tasa de dilución a 1 h^{-1} (tiempo de retención hidráulica de 1 hora), se obtiene un caldo de fermentación cuya concentración de células es de 6 g/l (peso en seco) con una productividad celular de 6 g por litro de fermentador y por hora. En estas condiciones el caldo de fermentación contiene aproximadamente 2,5 g/l de ácido láctico, 5,5 g/l de ácido acético, 4,2 g/l de etanol y 8,4 g/l de ácido fórmico.

2. Producción de ácido láctico

En medio renovado

El cultivo se regula a un pH de 6 y a una temperatura de 50°C . El fermentador se alimenta en continuo con un medio de cultivo cuyas concentraciones de factores de crecimiento (F) y de glucosa son dependientes de la concentración de células que se desea obtener. Para producir el ácido láctico, se recomienda elegir una tasa de dilución de $0,4 \text{ h}^{-1}$ como nutrientes que limitan los factores de crecimiento F. Tomando la glucosa como fuente de energía, conviene elegir una relación glucosa/F de aproximadamente 2. Para calcular las concentraciones de factores de crecimiento (F) y de glucosa, se usarán las dos demandas específicas siguientes.

$$q F = 2,5 \text{ g/g}\cdot\text{h}$$

$$q G = 5 \text{ g/g}\cdot\text{h}$$

. $q F$ demanda específica de factores de crecimiento expresada en g (mezcla constituida por el 50% de extracto de levadura y el 50% de un hidrolizado de caseína (caseína hidrolizada por tripsina) por g de células (peso en seco)) y por hora.

. $q G$ demanda específica de glucosa expresada en g de glucosa por g de células (peso en seco).

Para calcular la concentración de ácido láctico, se tomará un rendimiento del orden de 80% con respecto a la glucosa consumida.

A modo de ejemplo, usando un medio de cultivo cuyas concentraciones de glucosa y de factores de crecimiento son respectivamente 63 y 31 g/l y fijando la tasa de dilución a $0,4 \text{ h}^{-1}$ (tiempo de retención hidráulica de 2,5 horas), se obtiene un caldo de fermentación cuya fermentación en células es de 5 g/l (peso en seco) y la concentración de ácido láctico de 50 g/l. En estas condiciones la productividad en ácido láctico es de 20 g por litro de fermentador y por hora.

Referencias bibliográficas

(1) **Hungate** y col., 1969, p. 117-132. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in Microbiology*. Vol. 3B. Academic Press, Nueva York.

(2) **Macy** y col., 1972, *Amer. J. Clin. Nutr.* 26:1318-1323

(3) **Meshbah** y col., 1989, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:159-167.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. Esto no forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO no asume ningún tipo de responsabilidad a este aspecto.

Documentos de patentes no citados en la descripción

• **M. OKAFOR**. *J. appl. Bact.*, 1975, vol. 28, 81-88 [0006]

• **HUNGATE et al.** *Methods in Microbiology. Academic Press*, 1969, vol. 3B, 117-132 [0108]

• **MACY et al.** *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1972, vol. 26, 1318-1323 [0108]

• **MESHBAH et al.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, vol. 39, 159-167 [0108]

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana depositada en la C.N.C.M. el 24 de noviembre de 1993 con el nº I-1378 y las cepas de la misma especie que poseen una catalasa, que tienen una temperatura de crecimiento de 25°C a 58,5°C con una temperatura de crecimiento óptima de 47°C a 53°C, que poseen propiedades amilolíticas y/o capaces de producir L(+)-lactato como producto de fermentación.

2. Cepas bacterianas según la reivindicación 1, **caracterizadas** por condiciones de crecimiento anaerobias y propiedades de microaerofilia, con un crecimiento a un pH de 5,4 a 8,5 aproximadamente.

3. Cepas bacterianas según la reivindicación 2, **caracterizadas** por un valor óptimo de crecimiento a un pH de 6,5 a 7,5.

4. Cepas bacterianas según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas** porque son heterolácticas y son capaces de producir a partir de hidratos de carbono, además de L(+)-lactato, sobre todo formiato, acetato y etanol.

5. Cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizadas** porque son Gram positivas.

6. Cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizadas** porque se presentan en forma de bastones aislados o en cadenas cortas con flagelos peritricos y no son esporuladas.

7. Cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizadas** por un contenido de su ADN en guanina y citosina inferior al 50% en moles, sobre todo del orden del 40% en moles.

8. Cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizadas** porque no contienen citocromo.

9. Cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizadas** porque al menos el 70% de su genoma es capaz de hibridarse con el ADN de la cepa depositada en la C.N.C.M. el 24 de noviembre de 1993, con el nº I-1378.

10. Cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizadas** porque se obtienen a partir de palma.

11. Procedimiento de cultivo de cepas bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque se opera en condiciones anaerobias, o como mínimo con baja presión parcial de oxígeno, a un pH de 5,4 a 8,5 aproximadamente, en particular de 6,5 a 7,5, en un medio de base que contiene un azúcar utilizable por estas cepas como fuente de energía y péptidos como fuente de nitrógeno.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque se usan hidratos de carbono como fuente de energía y de carbono, y péptidos como fuente de nitrógeno, sobre todo extractos de levadura o hidrolizados de proteínas.

13. Procedimiento de tratamiento de efluentes industriales con fines de descontaminación, **caracterizado** porque comprende la implementación de cepas bacterianas según una de las reivindicaciones 1 a 10.

14. Uso de las cepas bacterianas según una de las reivindicaciones 1 a 10 en procedimientos de fermentación alimentaria.

15. Uso de cepas según una de las reivindicaciones 1 a 10 para elaborar mutantes por transferencia de material genético entre estas cepas, las bacterias lácticas y los bacilos.

16. Procedimiento de producción de metabolitos como el L(+)-lactato, acetato, formiato, etanol, **caracterizado** porque comprende

- el cultivo de una cepa bacteriana según una de las reivindicaciones 1 a 10 en condiciones apropiadas para su desarrollo y para la producción del metabolito buscado, y
- la recuperación de los metabolitos producidos, el aislamiento del metabolito deseado y su purificación.

Fig. 1



Fig. 2

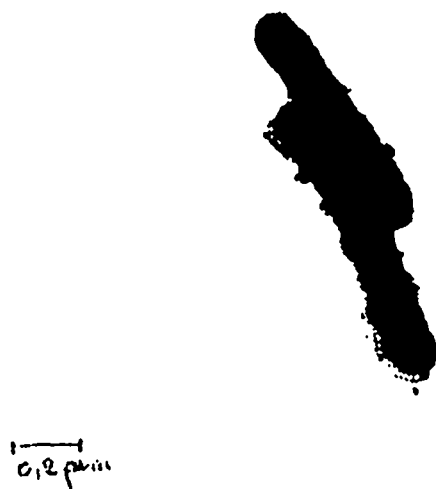


Fig. 3

