

CASO SIR. 1892.



1967

Handwritten numbers: 339847

339847

339847

PATENTE DE INVENCION

por 20 años

por "Un procedimiento para la recuperación de material nitrogenado de los microorganismos" -----

a favor de: THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, de nacionalidad inglesa, domiciliada en Britannic House, Finsbury Circus, LONDON, E.C.2 (Gran Bretaña).

MEMORIA DESCRIPTIVA

5 Se conocen procedimientos para la rotura de las paredes celulares de los microorganismos. Aún cuando estos métodos son eficientes para la rotura de las paredes celulares tienen defectos que disminuyen su valor como base para un proceso comercial para la recuperación de material nitrogenado citoplásmico de los microorganismos.

10 Un procedimiento ha sido propuesto para la rotura de las paredes celulares por medio de una enzima que ataca los componentes de compuestos carbohidratos, presentes en la pared celular, de la cual estos componentes forman parte. Así, ha sido previamente propuesto emplear un betaglucanato para atacar la celulosa y estructuras defendidas de la pared celular.

Distinto a este previamente propuesto procedimiento hay ahora un proceso en el cual, en una etapa inicial enzimica, es



- 2 - 339847

tratado un microorganismo con una enzima proteolítica, con lo cual los compuestos de carbohidratos y proteínas de la pared celular son atacados y después de esto la pared celular debilitada es atacada por medio de una enzima que ataca el componente carbohidrato de la pared celular, con lo cual la pared celular queda más debilitada o se rompe.

Así según la presente invención está suministra un procedimiento que comprende el tratamiento con una enzima proteolítica de un material, el cual consiste de o contiene células de un microorganismo, teniendo dichas células una pared celular, construída a lo menos en parte de a lo menos un compuesto que tiene un componente carbohidrato y un componente proteína, efectuándose el tratamiento de dicho material con la degeneración del componente proteína que toma lugar y en el que el componente carbohidrato es hecho susceptible al ataque enzimico, después desactivación o separación de la enzima proteolítica que está presente en las paredes celulares, después otro tratamiento de dicho material, o una fracción conteniendo el primer microorganismo tratado el cual ha sido recuperado de allí, con una enzima, capaz de atacar un carbohidrato presente en la pared celular, dando lugar a la degeneración de dicho carbohidrato y después, con o sin una etapa intermedia para el nuevo ataque o rotura de la pared celular, recuperación de una fracción acuosa de compuestos nitrogenados en solución y/o suspensión.

Con el término "microorganismo" usado aquí quedan incluidas las mezclas de microorganismos.

Los microorganismos que son tratados como aquí se describe pueden ser levaduras mohos o bacterias.

Las bacterias referidas en esta especificación son clasifica-

- 3 - 339847



das de acuerdo con el sistema descrito en el "Bergey's" Manual of Determinative Bacteriology" por "R.S. Breed, E.G.D. Murray y N.R. Smith (1957) 7ª Edición publicada por Williams (Baltimore, U.S.A.). Los fermentos son clasificados de acuerdo con el "The Yeasts—a Taxo-
5 mic Study" por Lodder y Kreger van Rij (1952) publicado por North Holland Publishing Company (Amsterdam).

De preferencia cuando una levadura es empleada ésta es de la familia Cryptococcaceae y particularmente de la subfamilia Crypto-
10 coccoidae; no obstante, si se desea pueden emplearse, por ejemplo, levaduras ascosporogeneous de la subfamilia Saccharomycoidae. Los preferidos géneros de la subfamilia Cryptococcoidae son los Torulopsis (también conocidos como Torula), Candida y Mycoderma. Las especies preferidas de levaduras son las siguientes. En parti-
15 cular es preferido emplear la provisión específica del número de referencia indicado; estos números de referencia referidos a pr-
visiones CBS referidos por el Centraal Bureau vor Schimmelculture, Baarn, de Holanda y por las provisiones INRA referidos por el Ins-
titut National de la Recherche Agronomique, de París, Francia.

		<u>linaje preferido</u>
	Candida lipolytica	CBS 599
20	Candida pulcherrima	CBS 610
	Candida utilis	CBS 890
	Candida utilis, Variati major	CBS 841
	Candida tropicalis	CBS 2317
	Candida arborea	
	Torulopsis colliculosa	CBS 133
	Hansenula anomala	CBS 110
	Oidium lactis	



339847

Neurospora	sitophila	
Mycoderma	cancollote	INRA; STV 11

De los citados el preferido es el *Candida lipolytica*, en particular.

5 Si se desea, el microorganismo puede ser un moho. Un linaje conveniente es el *Pencillium expansum*.

Si se desea el microorganismo puede ser una bacteria. Las bacterias convenientes son de uno de los órdenes:

Pseudomonadales, Enbacteriales y Actinomycetales

10 De preferencia las bacterias que pueden ser empleadas son de las familias *Corynebacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Achromobacteraceae*, *Actinomycetaceae*, *Rhizobiaceae*, *Bacillaceae* y *Pseudomonodaceae*. Las especies preferidas son el *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomon aeruginosa*.

15 Otras especies que pueden ser empleadas comprenden

- Bacillus amylobacter
- Pseudomonas natriegens
- Arthrobacter sp.
- Micrococcus sp.
- 20 Corynebacterium sp.
- Pseudomonas syringae
- Xanthomonas begoniae
- Flavobacterium devorans
- Acetobacter sp.
- 25 Actinomyces sp.
- Nocardia opaca

Convenientemente se emplean microorganismos capaces de desarrollarse en un hidrocarburo parafínico de cadena recta. De preferencia son empleados microorganismos que han sido desarrollados



en un hidrocarburo conteniendo substrato. El substrato conveniente comprende la kerosina, gas-oils y aceites lubricantes; estos materiales de carga pueden estar sin refinar o pueden haber sufrido un tratamiento de refinación, pero se requiere generalmente que contengan una proporción de hidrocarburos de cadena recta de manera que colmen el propósito de esta invención. Convenientemente se emplea una fracción de petróleo, conteniendo 3-45 % por peso de hidrocarburos de cadena recta.

La fracción de petróleo preferiblemente empleada consiste a lo menos de una parte de hidrocarburos de cadena recta y teniendo un peso molecular medio correspondiente a lo menos a 10 átomos de carbono por molécula.

Los métodos preferidos para usar en el cultivo de los microorganismos y para la recuperación del producto son los descritos en las especificaciones de las patentes británicas números 914.567-914-568-1017584 y 1017585- también en las patentes británicas números

- 44606/62 (SFP 1300)
- 46906/62 (SFP 1300-A)
- 20 49049/62 (SFP 1407)
- 49050/62 (SFP1408)
- 49052/62 (SFP 1410)
- 49055/62 (SFP 1413)
- 49056/62 (SFP 1414)
- 25 49057/62 (SFP 1415)
- 49060/62 (SFP1418)
- 49061/62 (SFP 1419)
- 49062/62 (SFP 1420)
- 49063/62 (SFP 1421)

339847



- 6 -

	2234/63	(SFP 1404)
	7623/63	(SFP 1429)
	19271/63	(SFP 1440)
	20803/63	(SFP 1442)
5	20804/63	(SFP 1443)
	21253/63	(SFP 1441)
	25210/63	(SFP 1401)
	38942/63	(SFP 1508)
	45005/63	(SFP 1616)
10	45004/63	(SFP 1626)
	27284/65	(SFP 1676)
	44388/65	(SFP 1700)
	4763/66	(SFP 1858)
	4765/66	(SFP 1870)
15	5640/66	(SFP 1872)

- también en las especificaciones de las patentes francesas números

92454	(SFP 1402)
925327	(SFP 1430)

De preferencia la enzima proteolítica empleada en el procedimiento de la invención es una enzima que tiene actividad para romper solamente un enlace entre dos aminoácidos específicos en una componente proteina de la pared celular, por lo cual la extensión de degradación del componente proteina está severamente limitado. Además, ya que puede ocurrir alguna penetración del citoplasma por la enzima proteolítica, el empleo de una enzima con esta actividad limitada es también deseable ya que se consigue que cualquier degradación de la proteina del citoplasma

339847



- 7 -

pueda ser limitada de manera similar.

Las enzimas proteolíticas convenientes para emplear en el procedimiento comprenden la pepsina, trypsina, bromelina, ficina y papaina.

5 El empleo de la papaina se prefiere. La cantidad conveniente de papaina empleada es 0.2-0.3 por peso del peso de la célula seca.

10 De preferencia, la enzima proteolítica es empleada bajo condiciones tales que una proporción substancial del componente celular nitrogenado es solubilizado.

De preferencia, no obstante, las condiciones bajo las cuales la enzima proteolítica es empleada son también tales que solamente una menor proporción de las proteínas citoplásmicas, es degradada, es decir convertida en polipeptidos de bajo peso molecular o en aminoácidos.

15 Es un hecho importante de la invención que la enzima sea desactivada o separada después de su empleo y antes del tratamiento con una enzima que ataque el carbohidrato de la célula. Como resultado del ataque al carbohidrato, la proteína o el citoplasma es hecho más vulnerable al ataque por una enzima proteolítica y la proporción de ataque a la proteína de dicho tipo será severo, es por esta razón que la desactivación o separación de la enzima proteolítica a la etapa apropiada es importante. Además durante la primera etapa del ataque por la enzima a la pared celular, puede ocurrir algo de ataque a la proteína citoplásmica y por esta razón también el periodo de contacto de la célula con la enzima antes de la separación o destrucción de dicha enzima debe ser limitado al periodo necesario para efectuar el ataque en la pared celular de proteína.



De preferencia la determinación de las condiciones convenientes para el uso de la enzima proteolítica es efectuada como sigue.

Después de la determinación del nitrógeno celular total, la muestra de microorganismos es tratada en una serie de pruebas, con
5 disminución de las cantidades de enzima.

El nitrógeno solubilizado total es luego estimado y la proporción siguiente es calculada:

solubilidad del nitrógeno total

nitrógeno celular total

La concentración de enzima empleada será la concentración mínima correspondiente al máximo de esta proporción.
10

De preferencia el material tratado que queda después del tratamiento con la enzima proteolítica es sometido a la fase de separación y si se desea a la fase acuosa así recuperada, con o sin tratamiento de intervención, puede ser reemplazada o reciclada para
15 el tratamiento de cantidades adicionales del microorganismo. La fase de separación es preferiblemente por centrifugación. Después de la fase de separación el microorganismo conteniendo fracciones es preferiblemente lavado con un medio acuoso, convenientemente agua, para separar la enzima proteolítica, a lo menos siempre que la enzima esté asociada con las paredes celulares.
20

El microorganismo lavado puede ser sometido a una fase adicional de separación, convenientemente por centrifugación.

El microorganismo, habiendo sido tratado para separar o destruir la enzima proteolítica asociada con la pared celular, debe
25 ser tratado con una enzima capaz de atacar los carbohidratos en la anexa etapa de tratamiento sin un indebido retraso y ciertamente antes que haya tiempo para la destrucción de las células por autólisis.



- 9 - 339847

En esta etapa adicional de tratamiento a lo menos algo de los componentes carbohidratos de la pared celular, por ejemplo la celulosa, con atacados. Puesto que las enzimas que son empleadas no son proteolíticas es posible operar bajo severas condiciones sin
5 substancial degradación de la proteína del citoplasma.

Después del tratamiento con enzimas para la degradación de los carbohidratos de la pared celular y también si se desea para la degradación de los lípidos, la fase acuosa contendrá una substancial proporción de la proteína del citoplasma en solución o
10 suspensión.

La fase acuosa con proteína suspendida coloidalmente puede ser separada, por ejemplo, por centrifugación.

Si se desea esta fase acuosa puede ahora ser evaporada para recuperar un producto sólido nitrogenado.

15 La invención es ilustrada sin carácter alguno limitativo con referencia a los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 1

25 kilogramos de una crema de levadura acuosa conteniendo 15% por peso de la levadura *Candida tropicalis* que ha sido desarrollada
20 en gas-oil, luego lavada con detergente no-iónico, fueron llevados a 7.6 pH por adición de una solución sosa 2N; 27 gramos de fosfato disódico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y 5.34 de ácido cítrico (ácido cítrico
1 H_2O) fué adicionado; la temperatura de la reacción de la mezcla fué llevada a 70°C, cuando esta temperatura fué alcanzada 15 gramos de pa-
25 pain (SCHWARTZ) y 15 gramos de hidrocioruro de cisteína fueron adicionados; la temperatura fué mantenida a 70°C durante una hora; el material fué luego centrifugado obteniéndose un residuo y un pro-



ducto líquido; este residuo fué lavado con 8 litros de agua desti-
lada y centrifugada. El residuo resultante fué tomado por 15 li-
tros de agua destilada, el pH fué ajustado a 5 por adición de una
solución 2N de ácido clorhídrico; 138 gramos de fosfato disódico
5 (PO₄HNa₂·12H₂O) y 38,1 gramos de ácido cítrico (ácido cítrico 1H₂O)
fueron adicionados; esta nueva mezcla fué calentada y mantenida a
40°C durante 2 horas en presencia de 25 gramos de celulosa (B50 fa-
briçada por SEAB) y 25 gramos de lipasa B (Rohm y Haas). El pro-
ducto fué centrifugado y el producto líquido obtenido fué adicio-
10 nado a los productos líquidos previamente obtenidos por centrifuga-
ción. La mezcla de líquidos fué secada por pulverización secante,
obteniéndose 2,25 kilogramos de producto seco conteniendo 11% por
peso de nitrógeno.

Ejemplo 2

10 kilogramos de una suspensión acuosa de levadura de panade-
ro conteniendo 15% de material seco (*Saccharomyces cerevisiae*) fue-
15 ron llevados a 7.6 pH por adición de una solución de sosa 2N; lue-
go fueron adicionados 3 litros de regulador a 7.6 pH (390 ml de
una solución 0.2N de fosfato monosódico y 2610 ml de una solución
de fosfato disódico), la temperatura de la suspensión fué llevada
20 a 70°C; cuando esta temperatura fué alcanzada 6 gramos de SCHWRTZ
"FICINE" y 3 gramos de hidrocioruro de cisteina fueron adicio-
nados; esto fué dejado para digerir durante una hora y después de la
centrifugación fueron obtenidos un producto líquido y un residuo;
este residuo fué lavado con 3 litros de agua destilada y centrfu-
25 gado. El residuo resultante fué tomado por 3,3 litros de agua y
llevado a 5 pH por una solución de ácido clorhídrico 2N. Esta sus-
pensión fué mezclada con 3,3 litros de fosfato regulador - ácido
cítrico, para dar un pH=5. La temperatura fué mantenida a 40°C en

339847



- 11 -

presencia de 15 gr de celulosa (SEAB) y 15 gramos de lipasa B (Rohm y Haas) durante dos horas. El producto fué centrifugado y el líquido obtenido fué adicionado a los productos líquidos previamente obtenidos por centrifugación. La mezcla de líquidos fué secada por
5 pulverización secante. Sobre 700 gramos de producto seco conteniendo 10% por peso de nitrógeno fueron obtenidos.

N O T A

Por la patente de invención a que se refiere la presente memoria descriptiva se REIVINDICA la propiedad y la explotación exclusiva de:

- 10 1.- Un procedimiento para la recuperación de material nitrogenado de los microorganismos, caracterizado por el hecho que comprende el tratamiento con una enzima proteolítica un material que consiste de o contiene células de un microorganismo, dichas células
15 teniendo una pared celular, construída a lo menos en parte de a lo menos un compuesto que tiene un componente carbohidrato y un componente proteína, efectuándose el tratamiento de dicho material de manera que tome lugar la degeneración del componente proteína y de
20 manera que el componente carbohidrato es hecho susceptible para el ataque de la enzima, después de lo cual se desactiva o separa la enzima proteolítica que está presente en las paredes celulares, después se vuelve a tratar dicho material, o una fracción del mismo, con una enzima, capaz de atacar un carbohidrato presente en la pared celular, con lo cual toma lugar la degeneración de dicho carbohidrato y después, con o sin una etapa intermedia para el nuevo ataque
25 que o rotura de la pared celular, recuperación de una fracción acuosa que contiene compuestos nitrogenados en solución y/o suspensión.



2.- Un procedimiento, tal como el especificado en 1, caracterizado por el hecho que la enzima proteolítica es una enzima que tiene actividad para romper solamente un enlace entre dos aminoácidos específicos presentes en un componente proteina de la pared celular.

3.- Un procedimiento, tal como el especificado en 1 o 2, caracterizado por el hecho que la enzima proteolítica es seleccionada de la pepsina, trisina, bromelina, ficina y papaina.

4.- Un procedimiento, tal como el especificado en 3, caracterizado por el hecho que la papaina es empleada en una cantidad que constituye el 0.2 - 0.3% en peso de la célula seca del microorganismo.

5.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho que la enzima proteolítica es empleada bajo condiciones tales que una proporción substancial del componente nitrogenado de la pared celular es solubilizado pero solamente una muy pequeña proporción de la proteina citoplasmica es degradada.

6.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el material tratado remanente después del tratamiento con la enzima proteolítica es sometido a fase de separación.

7.- Un procedimiento, tal como el especificado en 6, caracterizado por el hecho que después de la fase de separación, la fracción que contiene microorganismo es lavada con un medio acuoso.

8.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho que la enzima que es empleada para atacar al carbohidrato de



la pared celular es una celulosa.

9.- Un procedimiento, tal como el especificado en 8, caracterizado por el hecho que con la celulosa es empleada una lipasa.

5 10.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una levadura.

10 11.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una levadura que contiene hidrocarburo parafínico de cadena recta.

12.- Un procedimiento, tal como el especificado en 11, caracterizado por el hecho que la levadura es de la familia Cryptococcaceae.

15 13.- Un procedimiento, tal como el especificado en 12, caracterizado por el hecho que la levadura es de la subfamilia Cryptococcoideae.

14.- Un procedimiento, tal como el especificado en 13, caracterizado por el hecho que la levadura es del género *Torulopsis*.

20 15.- Un procedimiento, tal como el especificado en 13, caracterizado por el hecho que la levadura es del género *Candida*.

16.- Un procedimiento, tal como el especificado en 15, caracterizado por el hecho que la levadura es *Candida lipolytica*.

17.- Un procedimiento, tal como el especificado en 15, caracterizado por el hecho que la levadura es *Candida tropicalis*.

25 18.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una bacteria.



19.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el microorganismo ha sido cultivado en un substrato que contiene hidrocarburo.

20.- "Un procedimiento para la recuperación de material nitrogenado de los microorganismos".

Consta la presente memoria descriptiva de catorce hojas foliadas, escritas por una sola cara.

Barcelona, 15 de Abril de 1967.

E. LAVIN REYNALDO
p. p.