

P. 43.208.-
2121 S/RAP

373015



Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C-12</u>
SUBCLASE <u>B</u>

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de STAMICARBON N.V.

entidad / ~~de nacionalidad~~ holandesa

con domicilio en van der Maesenstraat 2, Heerlen, Holanda

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR PROTEINAS" (Clase In-
ternacional C12b)

16.12.69



La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar proteínas, cultivando Eumycetes ricos en proteínas, bajo condiciones aerobias, en un medio líquido de cultivo concreto.

5 Se han propuesto diversas sustancias como fuentes de carbono en síntesis de proteínas de esta clase. Las melazas se han usado desde hace mucho para tal fin, y recientemente se han usado hidrocarburos.

10 Se ha hallado ahora que se puede efectuar un método particularmente útil para producir material celular rico en proteínas, con grandes rendimientos, por uso de un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono de una mezcla de ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos que con-
15 tienen menos de 8 átomos de carbono por molécula. Se dispone con facilidad y baratura de tales mezclas de ácidos carboxílicos, en grandes cantidades, en el agua de lavado obtenida durante la preparación de ciclohexanona a partir de ciclohexano o ciclohexanol, en la que el producto final
20 crudo es lavado con agua y/o una solución diluída de hidróxido sódico.

 El agua de lavado obtenida de la producción de ciclohexanona según se ha descrito antes solo es desechada normalmente, en la mayoría de los casos, tras una costosa purificación, por ejemplo por rotura biológica de los ácidos orgánicos contenidos en ella. El procedimiento según la in-
25 vención no solo purifica el agua de lavado, sino que también produce un producto valioso, sin que se requiera ninguna purificación previa.

30 Se pueden obtener resultados particularmente buenos, con un medio de cultivo que contenga tal mezcla de ácidos,

373015



79
si durante el cultivo de Fumycetes rico en proteína se man-
tiene el pH del medio líquido de cultivo en un valor com-
prendido entre 5,5 y 8. Dado que la concentración de ácido
en el medio de cultivo disminuye durante el crecimiento
5 del microorganismo, para mantener el pH en el valor desea-
do es necesario añadir un agente de control de pH durante
el crecimiento, por ejemplo ácido sulfúrico o un ácido si-
milar, o usar un medio de cultivo tamponizado.

Para efectuar la invención se pueden usar diversos
10 géneros de Fumycetes, por ejemplo los géneros Candida,
Trichosporon, Oospora, Hansenula, Pullularia, Aspergillus,
Penicillium, Venturia y Botrytis. Se pueden obtener buenos
resultados usando cepas de levadura que pertenecen al gé-
nero Candida, por ejemplo cepas de Candida lipolytica,
15 Candida brumptii, Candida tropicalis y Candida utilis. Tam-
bién se pueden usar con éxito cepas de, por ejemplo, -
Trichosporon cutaneum y Oospora lactis.

Además de dicha fuente de carbono, el medio de culti-
vo contiene otros nutrientes usuales, por ejemplo una fuen-
20 te de nitrógeno, una fuente de fosfato, una fuente de mag-
nesio y, cuando es necesario, una fuente de vitaminas. En-
tre las fuentes de nitrógeno adecuadas se incluyen el ni-
trato amónico, sulfato amónico, acetato amónico, urea y
aminoácidos. Entre las fuentes de fosfato se incluyen los
25 fosfatos primarios y secundarios de sodio, potasio y amo-
nio. Entre las fuentes de magnesio se incluyen el sulfato
de magnesio y cloruro de magnesio. Se pueden añadir sustan-
cias promotoras del crecimiento, por ejemplo las presentes
en el extracto de levadura o líquido de maceración de maíz.

30 El procedimiento según la invención se puede efectuar



continua o discontinuamente, a temperaturas que sean en general adecuadas para cultivar microorganismos, por ejemplo temperaturas de 25 a 37°C.

5 Cuando el procedimiento según la invención se lleva a cabo como procedimiento continuo, se puede añadir una pequeña proporción de una fuente de carbón fácilmente accesible para el microorganismo de que se trate, por ejemplo glucosa si el microorganismo es una cepa Candida, o ácido acético en el caso de una cepa Trichosporon, con el resultado de que se puede usar una concentración relativamente alta de ácidos mono- y dicarboxílicos, en comparación con un procedimiento discontinuo. Cuando el procedimiento de la invención se lleva a cabo de manera continua, se pueden obtener excelentes resultados si se añaden al medio de cultivo, por gramo de carbono contenido en la fuente de carbono mono- y dicarboxílico, de 1 a 10 mg de carbono en forma de una fuente de carbono fácilmente accesible. La fuente de carbono mono- y dicarboxílico puede ser suministrada luego continuamente al medio de cultivo, en 10 concentración de 25 a 30 g/litro, calculado como carbono.

15

20

Se presentan los siguientes ejemplos de la invención.

Ejemplo 1

Se eligieron diversos microorganismos adecuado, como sigue:

25 Se mezcló 1 g de corteza de queso de cabra con 100 ml de una solución acuosa de sal de cocina doméstica (concentración 0,8% en peso), y se homogeneizó. Unas porciones diluídas de la suspensión resultante fueron untadas en un medio de agar que tenía un valor del pH igual a 6,5, y la



siguiente composición:

	Acido adípico	1	g/litro
	Acido butirico	0,5	g/litro
	Acido valérico	0,7	g/litro
5	Acido hidroxicapropico	0,7	g/litro
	Acido acético	0,05	g/litro
	Sulfato amónico	3	g/litro
	Fosfato potásico primario	7	g/litro
	Sulfato de magnesio.7H ₂ O	0,4	g/litro
10	Extracto de levadura	0,1	g/litro
	Agar	15	g/litro

Tras 5 dias de incubación a 30°C se aislaron de las placas de agar diversos cultivos puros, principalmente cultivos pertenecientes al género Candida.

15

Ejemplo 2

Una cepa de Candida brumptii, aislada como se ha descrito en el ejemplo 1, fué sembrada en extracto de malta, y luego incubada durante 18 horas a 30°C, en un incubador de agitación.

20

Del cultivo activo obtenido de esta manera, se sembraron 0,2 ml en un matraz de 300 ml, en el que se habían introducido previamente 50 ml de un medio líquido de cultivo, el cual medio tenía un pH igual a 6,5 y la siguiente composición:

16.12.69

373015



	Acido adípico	1,00 g/litro
	Acido butírico	0,50 g/litro
	Acido valérico	0,74 g/litro
	Acido hidroxicaproico	0,72 g/litro
5	Acido acético	0,10 g/litro
	Sulfato amónico	3,00 g/litro
	Sulfato de potasio primario	7,00 g/litro
	Sulfato de magnesio.7H ₂ O	0,40 g/litro
	Extracto de levadura	0,10 g/litro

10 Después se aplicó una incubación a 30°C durante 24 horas, y el material celular resultante fué aislado por centrifugación, lavado y secado.

El rendimiento fué 1,5 g de células de levadura por litro de medio de cultivo.

15 El contenido de proteína cruda en la levadura fué 54% en peso.

Ejemplo 3

20 Una cepa de Candida lipolytica, aislada como se ha descrito en el ejemplo 1, fué precultivada en extracto de malta, de la misma manera descrita en el ejemplo 2.

25 Se sembraron 10 ml del cultivo activo resultante, en un recipiente de fermentación, de 1,5 litros, que contenía 1 litro de un medio líquido de cultivo obtenido añadiendo 3 g de sulfato amónico, 1 g de fosfato monopotásico, 0,4 g de sulfato de magnesio.7H₂O y 1 ml de líquido de maceración de maíz, a 50 ml de agua de lavado obtenida en la preparación de ciclohexanona, y añadiendo agua hasta 1 litro.

El agua de lavado contenía 1,44 equivalentes gramo



de ácido por litro, compuestos como sigue:

- 5 C,114 eq-g de ácido fórmico
- 0,054 eq-g de ácido acético
- 0,028 eq-g de ácido propiónico
- 0,088 eq-g de ácido butírico
- 0,308 eq-g de ácido valérico
- 0,068 eq-g de gamma-valerolactona
- 0,076 eq-g de ácido caproico
- 0,158 eq-g de ácido epsilon-hidroxicaproico
- 10 0,028 eq-g de ácido succínico
- 0,010 eq-g de ácido oxálico
- 0,080 eq-g de ácido glutárico
- 0,262 eq-g de ácido adípico

15 Tras sembrar, el líquido fué agitado en el recipiente de fermentación durante 24 horas a 28°C, mediante un agitador de turbina (1200 rpm), y aireado con 60 litros de aire por hora, manteniéndose entretanto el pH a 6,5, por adición continua de ácido sulfúrico. El material celular resultante fué aislado luego por centrifugación, lavado y

20 secado.

El rendimiento fué 2,4 g de material celular seco, que tenía un contenido crudo de proteínas del 54% en peso. De la cantidad original de carbono presente en los ácidos orgánicos, se convirtió el 84%.

25 Ejemplo 4

Una cepa de Candida tropicalis, obtenida de la manera descrita en el ejemplo 1, fué precultivada en extracto de malta.

Se sembraron 0,2 ml del cultivo activo resultante en



un matraz de 300 ml que contenía 50 ml de un medio líquido de cultivo, de pH 5,5, que tenía la siguiente composición:

	Acido acético	0,27 g/litro
5	Acido propiónico	0,11 g/litro
	Acido butírico	0,18 g/litro
	Acido valérico	0,05 g/litro
	Acido oxálico	0,74 g/litro
	Acido succínico	0,15 g/litro
10	Acido glutárico	0,40 g/litro
	Acido adípico	1,42 g/litro
	Acido epsilon-hidroxicaproico	0,56 g/litro
	Sulfato amónico	3,00 g/litro
	Sulfato monopotásico	1,00 g/litro
15	Sulfato de magnesio	0,20 g/litro
	Extracto de levadura	0,50 g/litro

Tras 48 horas de cultivo en un incubador de agitación a 30°C, una cantidad de 5 ml del medio de cultivo resultante fué sembrada en 50 ml de medio de cultivo de la misma composición original anteriormente indicada. Tras 36 horas de cultivo a 30°C, esto dió 1,2 g de levadura seca por litro de medio de cultivo.

Ejemplo 5

25 La cepa Candida utilis, variedad maior, fué precultivada en extracto de malta, y cultivada luego durante 24 horas a 32°C, de la misma manera y en el mismo medio de cultivo descritos en el ejemplo 3.

30 Después se efectuó el cultivo de forma continua, añadiéndose en cantidad de 60 ml/hora un medio líquido

793



de cultivo obtenido añadiendo 7,5 g de sulfato amónico,
 5 g de sulfato monopotásico, 2 g de fosfato de magnesio.
 7H₂O, 2 g de extracto de levadura y 2 g de glucosa, a 250
 ml del agua de lavado indicada en el ejemplo 3, llevada
 5 con agua hasta 1 litro.

Se retiró continuamente medio de cultivo del recipien-
 te de fermentación, en cantidad de 60 ml/hora. Por adición
 de ácido sulfúrico, el pH del contenido del recipiente de
 fermentación fué mantenido en 6,5. El rendimiento fué 13,5
 10 g de levadura seca, con un contenido de proteínas crudas
 igual al 55% en peso, por litro de medio de cultivo retira-
 do.

Quando se repitió este experimento de procedimiento
 continuo, esta vez sin añadir glucosa, la concentración de
 15 las células de levadura en el matraz de fermentación dis-
 minuyó lentamente, y el rendimiento de levadura seca dis-
 minuyó en 72 horas hasta menos de 1 g/litro de medio de
 cultivo.

Ejemplo 6

20 Una cepa de Oospora lactis, obtenida de la forma des-
 crita en el ejemplo 1, fué cultivada de la misma forma des-
 crita en el ejemplo 5, salvo en que el medio líquido de
 cultivo nuevo fué suministrado en cantidad de 80 ml/hora,
 25 y el medio que contenía levadura fué retirado en la misma
 cantidad. El medio de cultivo retirado contenía 13,5 g
 de material celular seco por litro, y el contenido de proteí-
 nas crudas en este material era 39% en peso.

30

16.12.69



Ejemplo 7

Tras haber sido precultivada en extracto de malta, una cepa de Candida lipolytica, aislada de la forma descrita en el ejemplo 1, fué cultivada durante 24 horas de la misma manera y en el mismo medio de cultivo descritos en el ejemplo 3.

Después se efectuó el cultivo de manera continua, suministrando medio de cultivo nuevo al recipiente de fermentación, en cantidad de 100 ml/hora, y retirando del matraz medio de cultivo que contenía levadura, análogamente en cantidad de 100 ml/hora. El medio de cultivo nuevo se había obtenido añadiendo 7,5 g de sulfato amónico, 5 g de fosfato monopotásico, 2 g de sulfato de magnesio. 7H₂O, 0,05 g de extracto de levadura y 1 g de glucosa, a 250 ml del agua de lavado mencionada en el ejemplo 3, llevada con agua hasta 1 litro.

Se aplicó la adición de ácido sulfúrico para mantener a 6,5 el pH del contenido del recipiente de fermentación.

El medio de cultivo que contenía levadura, descargado continuamente del recipiente de fermentación, fué introducido continuamente en un segundo recipiente de fermentación que tenía un volumen efectivo de 1 litro, al cual se suministraban al mismo tiempo 200 ml/hora del medio de cultivo nuevo antes mencionado, y en el que se mantenía análogamente el pH a 6,5, por adición de ácido sulfúrico. El líquido del segundo recipiente de fermentación fué agitado mediante un agitador de turbina, y aireado con 70 litros de aire por hora. Se retiró continuamente del segundo recipiente de fermentación un medio de cultivo



que contenía levadura, que tenía un contenido de levadura seca igual a 8,7 g/litro, en cantidad de 300 ml por hora. El contenido de proteínas crudas en la levadura seca fué 66,5% en peso.

5 Esta solicitud que corresponde a la presentada en Holanda el 31 de Octubre de 1968, bajo el Núm. 6815503, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- REIVINDICACIONES -

10 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

15 1º.- Un procedimiento para preparar proteínas, que comprende cultivar Eumycetes ricos en proteínas bajo condiciones aerobicas en un medio de cultivo líquido que contiene una mezcla de ácidos alifáticos mono y di-carboxílicos que tienen menos de 8 átomos de carbono por molécula, y mantener el pH del medio de cultivo, durante el cultivo
20 del microorganismo, a un valor comprendido entre 5,5 y 8.

25 2º.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual dicha mezcla de ácidos mono y dicarboxílico es la mezcla de ácidos que se obtiene en el agua de lavado derivada de los lavados del producto final crudo de la preparación de ciclohexanona a partir del ciclohexano o ciclohexanol.

16.12.69

373015



3º.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el cual el microorganismo usado es una cepa del género Cándida.

5 4º.- Un procedimiento según la reivindicación 3, en el cual dicha cepa es una de las especies Candida lypolytica, Candida brumptii, Candida tropicalis, y Candida utilis.

10 5º.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el cual el microorganismo usado es una cepa perteneciente a una de las especies Trichosporon cutaneum y Oospora lactis.

15 6º.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el cual es un procedimiento continuo y, en el que, por gramo de carbono contenido en el citado manantial de carbono mono y di-carboxílico, son incorporados al medio de cultivo de 1 a 10 miligramos de carbono en forma de un manantial de carbono fácilmente accesible.

20 7º.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual, durante el cultivo del microorganismo, la temperatura es mantenida entre 25 y 37ºc.

8º.- Un procedimiento para preparar proteínas.

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



Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 DIC. 1969

P.A.

Alberio de Elizaburu
Por Poder.
[Handwritten signature]

373015