

407.000

Int. Cl.: C12D



407000

PATENTE DE INVENCION

per 20 años

per "Un procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en materiales proteínicos"-----

a favor de THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, de nacionalidad británica, domiciliada en Britannic House, Moer Lane, LONDRES (Inglaterra).

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a perfeccionamientos en y relativos a un procedimiento continuo para convertir hidrocarburos a material proteínico. En particular la invención se refiere a un procedimiento continuo para la producción de proteína monocelular por cultivo de una nueva estirpe de levadura en un hidrocarburo como el substrate de carbono.

En los recientes años un número de procedimientos han sido propuestos para la producción de proteína monocelular por cultivo de una levadura en un substrate de carbono, en presencia de un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre. Los procedimientos propuestos pudiendo ser discontinuos o continuos. Muchos linajes de levaduras que asimilan hidrocarburo han sido descubiertos como provechosos para ser usados en tales procedimientos.

POOR
QUALITY



5 Nuestros ahora suministramos un nuevo linaje de levadura que es particularmente conveniente para ser usado en procedimientos continuos a escala industrial del tipo precedente. El nuevo linaje permanece estable durante periodos prolongados de cultivo continuo y la levadura producida tiene un elevado contenido de proteina cruda.

10 En consecuencia la presente invención es un procedimiento para la conversión de un hidrocarburo en un material proteínico que comprende el cultivo continuo de linaje Candida Lipolytica C.B.S. número 6.331 en presencia de un hidrocarburo de cadena recta que tiene a lo menos 10 átomos de carbono por molécula, en un medio nutriente y un gas que contiene oxígeno libre.

15 Los hidrocarburos preferidos son normalmente parafinas recuperadas de fracciones de petróleo en los límites Kerosina e gasoil hirviente. En particular estos hidrocarburos son gasoil hirviente del orden de parafinas normales conteniendo 11 a 23 y principalmente 14 a 21 átomos de carbono por molécula y Kerosina hirviente del orden de parafinas normales conteniendo 10 a 13 átomos de carbono por molécula. Hidrocarburos de cadena recta obtenidos de materiales de carga de petróleo por tratamiento de criba molecular son los más convenientes.

20 Contenedores de proteina cruda en el orden de 63 a 65 por cien por peso en relación al peso seco del total de células pueden obtenerse por cultivo del nuevo linaje en la preferida Kerosina de parafinas normales.

Proporciones de producción de aproximadamente 5 gramos por litro por hora con un mínimo de aproximadamente 2.5 gramos por litro por hora pueden obtenerse usando el nuevo linaje. El li-



naje tiene un elevado factor de rendimiento de aproximadamente 1, es decir la proporción del peso de levadura producida en relación al peso del hidrocarburo utilizado por la levadura. Tiene una elevada proporción de desarrollo, particularmente en los hidrocarburos preferidos, siendo así que se puede operar a relativamente elevadas proporciones de dilución, por ejemplo proporciones de desarrollo (tiempos de grupo) de menos que 4 horas dan un D_{max} de más de 0.15 h^{-1} . Puede ser cultivado a unas proporciones de desarrollo comercialmente aceptables y factores de rendimiento bajo condiciones no asépticas en presencia de contaminación bacteriana. Cuando se cultiva en un recipiente a presión bajo una elevada sobrepresión, por ejemplo del orden de 1.5 a 5.0 kilogramos por centímetro cuadrado absoluta, preferiblemente bajo condiciones asépticas de operación el linaje muestra un marcado incremento del factor rendimiento. Estos hechos contribuyen notablemente en la economía general del procedimiento ya que el factor rendimiento es una medida de la eficacia en la cual los hidrocarburos asimilables son convertidos en materiales celulares.

El procedimiento puede ser efectuado usando cualquiera de las conocidas técnicas de cultivo. Los órdenes de temperaturas preferidas son de 27 a 33°C y los órdenes de pH son 4.0 a 5.5. El más conveniente cultivo se efectúa en un recipiente a presión aireado, agitado. Cuando se aplica sobrepresión ésta puede ser del orden de 5 kilogramos por centímetro cuadrado absoluta. Una característica complementaria del nuevo linaje es que se pueden mantener las elevadas proporciones de desarrollo sobre una amplia escala de temperatura y pH, tal como por ejemplo un pH del orden

407000



- 4 -

de 3 a 5.7 y una temperatura del orden de 20 a 35°C. Este facilita, en operación no aséptica, la selección de condiciones de pH y temperatura que causan el "fracaso" de la contaminación microbiana o a lo menos suprimen la contaminación a niveles que no afecten sustancialmente la producción de biomas de levadura. Per ejemplo la contaminación bacteriana puede ser suprimida operando a un pH del orden de 4 a 4.8 y convenientemente la temperatura puede ser del orden de aproximadamente 27 a 33°C.

10 El nuevo linaje es un mutante derivado de una levadura silvestre que nosotros hemos aislado e identificado como Candida lipolytica de acuerdo con el criterio taxonómico de Lodder. El nuevo linaje está depositado en el Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baara, Holanda, donde tiene el C.B.S. número 6.331.

15 Además de las características anteriormente descritas el nuevo linaje tiene las siguientes otras.

Las características morfológicas del nuevo linaje son las mismas que para la Candida lipolytica C.S.A. linaje número 2078 y C.M.I. linaje 93.743. Estas características corresponden a la descripción general de C. lipolytica variante lipolytica dada por J. 20 Lodder, "The Yeasts. A Taxonomic study" 2 Edición 1970 páginas 991-993, excepto en cuanto placado en glucosa/extracto de levadura/peptona agar e placas cultivo Dalman en harina de maiz agar (Lodder 2 Edición 1970 página 992), las colonias son de color crema, uniforme, tiene una superficie mate sin formación 25 de pliegues ni de su seudomicelio.

Estos contrastes con la formación de seudomicelio en los linajes típicos de Candida lipolytica, por ejemplo C.B.S. Linaje 2078 y C.M.I. Linaje 93743.



Las características fisiológicas son idénticas que aquellas de la Colipolytica C.B.S. Linaje nº 2078 y C.M.L. Linaje 93743 mencionadas antes.

5 (a) Observaciones morfológicas cuando se cultiva en glucosa extracto de levadura peptona agua.

10 Cuando se cultiva durante 3 días a 25°C en glucosa extracto de levadura peptona agua las células son cortas ovoides e largas ovoides y miden 3 a 6 por 5 a 11 micrones. Raramente algunas células alargadas se observan que miden aproximadamente 20 micrones en longitud. No se forma película.

(b) Formación de Ascosperas e Ballistesperas

No se forman ascosporas e ballistesperas cuando el linaje se desarrolla en el medio de esperulación general.

(c) Asimilación de nitrato y descomposición de urea.

15 El linaje no asimila nitrato potásico. La urea es descompuesta.

(d) Utilización de azúcares

20 El linaje no fermentará azúcares pero los compuestos siguientes son asimilados: glucosa, etanol, glicerol, eritritol y ácido succínico.

Los compuestos siguientes no son asimilables:

25 galactosa, sorbosa, d-xilosa-L-ranosa-sucrosa, maltosa, celobiosa, trealosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, melcitoso, inulina, almidón soluble, d-xilosa, L-arabinosa, d-arabinosa, ribitol, galactitol, d-manitol, d-glucitol. α -metil d-glucosida, salicilina y inositol. La gelatina es licuada y la leche de ternera es peptonizada.

El desarrollo en medio libre vitaminado es débil y el des-

407000



- 6 -

relle es estimulada por la presencia de tiamina.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin caracter alguno limitativo de la misma.

EJEMPLO I

Candida Lipolytica linaje C.B.S. No 6.331, fué cultivada continuamente bajo condiciones asépticas en un agitador recipiente a presión aireado teniendo un volumen de trabajo de 1.800 litros. El substrate de carbono era una mezcla de Kerosina del orden de parafinas normales teniendo C_{10} a C_{13} átomos de carbono por molécula obtenida por sometimiento de material de carga petróleo a tratamiento de criba molecular. El medio nutritivo acuoso tenía la siguiente composición:

	H_3PO_4	1.594 gramos
	KCl	0.916 "
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.521 "
15	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.035 "
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.052 "
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.153 "
	$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	4.36×10^{-4} gramos
	H_2SO_4	0.172 "
20	Hidrócloruro de tiamina	220 miligramos
	Agua corriente para 1 litro.	

Después de un período inicial de arranque de aproximadamente 16 horas durante el cual el cultivo alcanzó una concentración de 16 gramos por litro la operación continua fué comenzada a una proporción de dilución de 0.16 volúmenes por volúmenes por hora, a temperatura de $32^{\circ}C$ y un pH de 5.5. El pH fué mantenido por adición de amoniaco como se requiere. El hidrocarburo fué alimentado a una proporción de 10 litros por hora y el medio nutritivo acuoso fué alimentado a una proporción



de 260 litros por hora. La fermentación fué aireada a 1.50 volumen por volumen por minuto y la presión en el interior del fermentador mantenida a 2.50 kilogramos por centímetro cuadrado absoluta.

5 El factor rendimiento fué 0.88 (Factor rendimiento = peso de producto levadura por el peso de hidrocarburo utilizado por el peso de levadura producida). El caldo tenía un peso en células secas de 23.6 gramos por litro. El curso fué continuado durante 1000 horas. Durante este periodo de duración el caldo fué probado a intervalos de 24 horas y el cultivo examinado por variación de linaje. Las pruebas fueron placadas en Agar Dextrosa de Sabouraud (Oxid) y Agar Extracto de Malta (Oxid). (Oxid es una marca registrada). Las placas fueron incubadas durante 10 3 días a 30°C. Las colonias resultantes fueron de color crema uniforme, con una superficie mate y sin pliegues.

15

A través de la fermentación no se observaron señales de variación en el placado. No se observaron pseudomicelio por examen con el microscopio.

El contenido de proteína cruda fué apreciado a intervalos regulares por el procedimiento dado en "Fertiliser and Feeding 20 Stuffs Regulation" Statutory Instrument No 218, 1968.

La levadura tenía un contenido de proteína cruda del orden de 63 a 66 por cien por peso en relación al peso seco de la levadura.

EXPERIMENTO

Por vía de comparación un conocido linaje de Candida lipolytica utilizando hidrocarburo, a saber, C.M.I. linaje número

407000



- 8 -

93.743 fue sometida a idénticas condiciones de cultivo que ha sido descrita aquí antes para el nuevo linaje. C.B.S. número 6.331.

Al final de las 16 horas de período de arranque la concentración celular era aproximadamente 1.5 gramos por litro. Debido a la lenta preparación de desarrollo el período de arranque fue extendido hasta que una concentración celular de 16 gramos por litro fue alcanzada (es decir después de aproximadamente 40 horas). La operación continúa fue comenzada a una preparación de dilución de 0.15 volúmenes por volumen por hora y el cultivo lavado. No fue posible activar la continuidad de la operación a causa de que la preparación de desarrollo era demasiado lenta.

La continuidad de operación fue activada con una preparación de dilución inferior a 0.07 volúmenes por volumen por hora usando una sobrepresión de 1.5 kilogramos por centímetro cuadrado absoluto. El contenido de proteína cruda del producto de levadura fue aproximadamente 54 por cien por peso en relación al peso seco de la levadura. Las colonias placadas eran de color crema, con pliegues, mate belludo y gruesamente replegada. El examen con microscopio mostro abundante santomielio; también se apreció reptato micelio.

El factor rendimiento fue 0.58.

EJEMPLO 2

C. lipolytica C.B.S. linaje 6.331 fue cultivada bajo las mismas condiciones y la misma preparación de dilución 0.07 volúmenes por volumen por hora y una sobrepresión de 1.5 kilogramos por centímetro cuadrado absoluta, como para el C.M.I. 93.743 linaje de C. lipolytica anteriormente descrito por vía de comparación



en el experimento seguido en el ejemplo 1.

El factor rendimiento fue 0.73 y el contenido de proteina cruda fue aproximadamente 59 por cien por peso en relación al peso seco de la levadura.

EJEMPLO 3

5 Candida lipolytica linaje C.B.S. 6331 fue inculada en un medio nutriente acuoso y un hidrocarburo como la fuente de carbono utilizable encerrado en un recipiente a presión, aireado y agitado teniendo un volumen de trabajo de 55 litros. El hidrocarburo fue una mezcla de gasoil del orden de parafinas normales

10 teniendo 11 a 18 y principalmente 14 a 17 átomos de carbonos por molécula que fue obtenida por sometimiento de un material de carga petroléa gasoil a un tratamiento de criba molecular. El medio nutriente acuoso tenía la siguiente composición:-

	H_3PO_4	1.455 gramos
15	K_2SO_4	0.969 "
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.470 "
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.138 "
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.047 "
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.041 "
20	$(NH_4)_2SO_4$	0.500 "
	$CaSO_4 \cdot 5H_2O$	0.413 miligramos
	Tiamina HCl	203 "

Agua corriente para 1 litro

25 Después de un periodo de desarrollo de producción, la operación continua fue comenzada a una proporción de dilución de 0.14 a 0.15 volúmenes por volumen por hora a temperatura de 32° y un pH de 4.5, mantenida por adición de amoníaco como se requiere. El hidrocarburo fue alimentado a una proporción de 220.5 ml/h y el medio nutriente acuoso fue alimentado a una proporción de 7.42 litros/hora. La fermentación fue mecánicamente

407000



- 10 -

agitada, aireada a 0.75 volúmenes por volumen por minuto y la presión dentro del fermentador fué mantenida a 1.5 kilogramos por centímetro cuadrado absoluta.

5 Al cabo de 240 horas después de la inculación inicial con levadura de cultivo, una inculación conteniendo cinco bacterias pertenecientes al género Acinetobacter, Escherichia, Paracelobacterium y Pseudomonas fué añadida al caldo fermentador. Las cantidades de bacterias apartadas a intervalos de aproximadamente
10 ciento ochenta horas en muestras de caldo fermentador han indicado que el número de células bacteriales viables presente varia entre 300,000 y 2,500,000 por mililitro de caldo.

Después de operar durante 330 a 402 horas la densidad celular de la levadura (Candida lipolytica linaje C.B.S. 6.331) fué 23.5 gramos por litro y el factor rendimiento fué 0.99. El producto levadura tenía un contenido de proteína cruda de 59 por
15 cien por peso en relación al peso del total de células.

El pH del caldo fué entonces elevado desde 4.5 a 4.8 durante un periodo de operación de 520 a 680 horas. Las cantidades de bacterias apartadas del caldo entre 800 y 1,200 horas de operación fueran del orden de 10^9 a 3×10^9 células por mililitro.
20 El número de células Candida lipolytica presente durante el mismo periodo fué de un orden similar a los números de células bacteriales.

Entre 1122 a 1218 horas de operación el peso de células seca de la levadura fué 21.3 gramos por litro y el factor rendimiento fué 0.96. El contenido de proteína cruda de la levadura fué aproximadamente 59 por cien por peso en relación al peso seco de la totalidad de células.
25



Después de 1218 horas de operación el pH fué incrementado de nueve a 5.0, entonces la operación del fermentador vino a resultar insegura, difícil de controlar y dió un factor de rendimientos de levadura variable. Al mismo tiempo la cantidad bacteriana aumentó hasta exceder la cantidad de levadura.

Estos ejemplos demuestran satisfactoria la operación continua de una fermentación para la producción de biomas levadura usando el nuevo linaje Candida lipolytica linaje C.B.S. 6.331 en presencia de un nivel sustancial de contaminación bacteriana.

También demuestran que la producción comercial de biomas levadura no es satisfactoria cuando la fermentación es operada bajo condiciones no asépticas a valores pH de aproximadamente 5 o más elevados.

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:

1.- Un procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en materiales proteínicos, caracterizado por el hecho que consiste en cultivar de modo continuo Candida lipolytica linaje CBS número 6331 en presencia de un hidrocarburo de cadena recta teniendo a lo menos 10 átomos de carbono por molécula, un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre.

2.- Un procedimiento, tal como el especificado en 1, caracterizado por el hecho que se efectúa en un recipiente a presión a una sobrepresión del orden de 1.5 a 5.0 kilogramos por centímetro cuadrado absoluta.

3.- Un procedimiento, tal como el especificado en 1 e 2, caracterizado por el hecho que la temperatura es del orden de 27 a 30°C.

4.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cual-

407000



- 12 -

quiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el pH del medio acuoso es del orden de 4.0 a 5.5.

5.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que se efectúa bajo condiciones asépticas.

6.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 4, caracterizado por el hecho que se efectúa bajo condiciones no asépticas de operación y un pH del orden de 4. a 4.8.

7.- "Un procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en materiales proteínicos".

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

Barcelona, 16 de Septiembre de 1972.

m/c