

PATENTE DE INVENCION

PLC. 184 (P.G.5419).

414831



F.P. 2-6-75

Int. Cl.<sup>2</sup>: C12D

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

PROCEDIMIENTO CONTINUO PARA LA PRODUCCION DE  
ACIDO CITRICO.

*Solicitante:* PFIZER CORPORATION, entidad panameña, residente en  
Calle 15½, Avenida Santa Isabel, Colón, República  
del Panamá.

La presente invención se relaciona con un proceso  
de fermentación para la producción de ácido cítrico y, en  
particular, se relaciona con un proceso continuo para la  
producción de ácido cítrico mediante propagación de un  
5. microorganismo acumulador de ácido cítrico en un medio nu-



triente que comprende hidrocarburo como fuente principal de carbono asimilable.

5. Constituye un objeto de la invención proporcionar un proceso continuo para esta finalidad, que tiene un rendimiento global mejorado de ácido cítrico, basado en la fuente de hidrocarburo, y una velocidad de producción mejorada de ácido cítrico, en comparación con los procesos de fermentación anteriormente conocidos para la producción de ácido cítrico a partir de hidrocarburos.

10. De acuerdo con la invención, el proceso continuo para la producción de ácido cítrico comprende fermentar aerobícamente un medio acuoso que contiene hidrocarburo dispersado en el mismo como fuente principal de carbono asimilable con un microorganismo acumulador de ácido cítrico, alimentar continuamente al medio de fermentación hidrocarburo y nutrientes esenciales para el microorganismo, extraer continuamente medio que contiene ácido cítrico en una proporción tal que el medio de fermentación se mantenga a un volumen prácticamente constante, mantener el pH del medio de fermentación en un valor del orden de 2,2 a 4,0 y la temperatura del medio de fermentación en un valor del orden de 22 a 32°C, y recuperar ácido cítrico del medio extraído.

25. El medio de fermentación puede estar contenido en un recipiente adecuado, dotado con medios de agitación, si es necesario, medios para introducir aire en el medio, medios para introducir el hidrocarburo y los nutrientes esenciales en el medio, medios de rebose para la extracción del medio y para mantener el volumen del medio del recipiente prácticamente constante y medios para controlar el pH y la temperatura.

30. Los microorganismos acumuladores de ácido cítrico



capaces de utilizar hidrocarburo como fuente principal de carbono asimilable en el proceso de la presente invención, incluyen levaduras del género Candida, en particular la especie Candida lipolytica. Pueden emplearse varias cepas de Candida lipolytica, por ejemplo, las descritas en las Patentes británicas Nos. 1.203.006, 1.211.246, 1.297.243 y 1.304.753, y en la Patente belga No. 765.165, incluyendo las siguientes cepas publicamente disponibles:

- Cepa Candida lipolytica
10. ATCC - 8661  
ATCC - 8662  
ATCC - 9772  
ATCC - 16617  
ATCC - 16618
15. ATCC - 20114 (IFO - 1437)  
ATCC - 20228  
ATCC - 20237 (IFO - 1463)  
CBS - 599 , cepa Jacobsen  
CBS - 2070, cepa Polacchi
20. CBS - 2071, cepa Zach  
CBS - 2073, cepa Verona  
CBS - 2078, cepa Bruyn  
IFO - 1545  
IFO - 1566
25. IMI - 93743  
NRRL - Y - 1094

Otras especies de Candida que son capaces de utilizar hidrocarburo y acumular ácido cítrico, incluyen:

30. C. atmosphaerica, C. guillermondii, C. parapsilosis, C. brumptii, C. tropicalis y C. zeylanoides. En las Patentes británicas Nos.



1.203.006, 1.204.635 y 1.278.013, se describen cepas publicamente disponibles de las anteriores que pueden ser utilizadas.

5. El hidrocarburo que forma la fuente principal de carbono asimilable, consiste esencialmente, con preferencia, en uno o más alcanos ó 1-alquenos, de cadena recta, conteniendo de 9 a 19 átomos de carbono, particularmente n-alcanos conteniendo de 12 a 16 átomos de carbono o de 14 a 19 átomos de carbono.

10. El hidrocarburo se alimenta continuamente al medio de fermentación o bien por separado o bien dispersado en una solución acuosa que suministra los nutrientes esenciales para el microorganismo. En cualquier caso, el hidrocarburo se alimenta generalmente en un nivel del 5 al 20 % en peso aproximadamente (es decir, 50 a 200 g/litro) basado en el volúmen de la solución acuosa que suministra los nutrientes esenciales,

15. si bien este aspecto no es crítico y puede utilizarse un nivel inferior o superior de hidrocarburo. Los nutrientes esenciales incluyen las fuentes disponibles de nitrógeno, de las cuales se prefieren las sales nitrogenadas tales como sulfato amónico, cloruro amónico y nitrato amónico y compuestos nitrogenados orgánicos simples tal como urea, si bien pueden utilizarse otras

20. fuentes nitrogenadas orgánicas tales como aminoácidos y peptonas. Naturalmente, ya se conoce que aquellas vitaminas como las contenidas en el complejo de vitamina B, en particular tiamina, y aquellos cationes y aniones minerales tales como

25. magnesio, potasio, fosfato y sulfato, son o pueden ser esenciales para el crecimiento de levaduras y se incluyen deliberadamente en forma de sales en la solución nutriente esencial. Dichas sales contienen también normalmente, como impurezas,

30. elementos de trazas esenciales, tales como hierro, zinc, cobre,



manganeso y cobalto, pero estos elementos se añaden preferiblemente en forma de una solución de elementos de trazas a la solución nutriente esencial.

5. El medio de fermentación puede contener también otros ingredientes, tales como un surfactante, para mantener el hidrocarburo en un estado finamente dispersado en la fase acuosa, y un agente antiespumante.

10. El pH del medio de fermentación puede mantenerse dentro de la gama deseada mediante la adición de un álcali en cualquier forma, pero más convenientemente mediante la adición de amoníaco en forma gaseosa o acuosa. Con preferencia, el pH se mantiene entre 2,8 y 3,5, más preferiblemente entre 3,2 y 3,5. La temperatura del medio de fermentación puede controlarse por cualquier medio conveniente, con preferencia entre 26 y 30°C, por ejemplo mediante tubos o serpentines de refrigeración sumergidos en el medio, o mediante una camisa de refrigeración exterior.

20. La aireación del medio de fermentación puede realizarse de cualquier modo adecuado, por ejemplo, burbujeando aire a través del medio y con preferencia se utilizará de 0,3 a 1,5 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto, por ejemplo, de 0,48 a 0,62 vol./vol./min. El medio puede agitarse también para incrementar la eficacia de aireación y de dispersión del hidrocarburo en el medio, si es necesario.

25. El procedimiento continuo de la invención puede estar precedido por una fermentación discontinua de un medio con una composición similar que contiene inicialmente una fuente de nitrógeno asimilable y una concentración de hidrocarburo adecuadamente alta, por ejemplo, del orden de 50 a 200 g por litro, y que tiene un pH inicial comprendido entre 5 y 8, con prefe-
- 30.



5. rencia entre 7 y 7,5, para estimular el crecimiento del micro-organismo. A medida que avanza la fermentación discontinua y se produce el ácido, el pH disminuye y se estabiliza en un valor comprendido entre 2,2 y 4,0, con preferencia entre 2,8 y 3,5, más preferiblemente entre 3,2 y 3,5, mediante la adición de álcali, por ejemplo sosa cáustica o amoniaco.
10. El amoniaco o el hidróxido amónico proporciona la doble función de controlar el pH y servir como fuente de nitrógeno asimilable. Si se utiliza como agente neutralizante, hidróxido sódico o potásico, deberá proporcionarse continuamente nitrógeno asimilable, con preferencia urea o una sal amónica.
15. Cuando el contenido en hidrocarburo ha disminuido a un nivel adecuadamente bajo, por ejemplo inferior a 30 g por litro, entonces se inicia la alimentación de hidrocarburo y nutrientes esenciales. Cuando el volumen alcanza un nivel pre-determinado, rebosa el medio que contiene ácido cítrico, extrayéndose como efluente.
20. La operación discontinua inicial del proceso será variable en cuanto a su longitud, en función del tiempo necesario para establecer el crecimiento del organismo y producción de ácido cítrico, y para reducir el contenido en hidrocarburo al nivel deseado, pero normalmente será del orden de 12 a 120 horas, más normalmente del orden de 50 a 100 horas. El crecimiento del organismo se dejará avanzar normalmente hasta que existan de  $1 \text{ a } 4 \times 10^9$  células por mililitro del medio, siendo lo suficientemente alto para mantener la producción de ácido cítrico en una proporción útil pero no tan elevado que el procesado del efluente resulte demasiado difícil o que se provoque una reducción de rendimiento en ácido cítrico.
- 25.
- 30.



5. El contenido en hidrocarburo del medio al final de la operación discontinua inicial, será también variable, de acuerdo con el nivel de hidrocarburo en el cual se desea operar el proceso continuo. Esto determinará el nivel de hidrocarburo en el efluente pudiendo ser lo suficientemente bajo para que pueda despreciarse el hidrocarburo del efluente; en el caso de que sea relativamente elevado, el hidrocarburo puede ser separado, por ejemplo por centrifugación, y reciclarse a la alimentación o pasarse como alimentación a un segundo proceso de fermentación continua realizado de acuerdo con la invención.

10. El proceso continuo de la invención puede operarse durante tanto tiempo como se desee, siendo unicamente el factor limitativo, en teoría, la estabilidad de la cepa particular de microorganismo empleada, pero en la práctica el proceso puede terminarse en cualquier etapa anterior. Para los fines de esta invención, puede considerarse como un proceso continuo, cualquier proceso que sea operado durante por lo menos 24 horas con alimentación continua de hidrocarburo y que incluya un periodo de extracción continua de medio que contiene ácido cítrico.

15. La fase acuosa del efluente se separa de las células del microorganismo y de cualquier hidrocarburo presente, por medios convencionales, por ejemplo por centrifugación y/o filtración, y el ácido cítrico se recupera de la fase acuosa, igualmente por medios convencionales, por ejemplo por precipitación como el citrato tri-cálcico.

20. Muchos microorganismos capaces de asimilar hidrocarburos y producir ácido cítrico a partir de los mismos, son capaces también de producir ácido isocítrico a partir de los mis-

30.



5. mos, lo cual es indeseable cuando el ácido cítrico constituye el producto deseado. Sorprendentemente, se ha encontrado que en un proceso continuo según la presente invención, se producen cantidades más pequeñas de ácido isocítrico, con relación al ácido cítrico, que en un proceso discontinuo utilizando la misma cepa de microorganismo.

El proceso de la presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

10. (A) Proceso discontinuo inicial:

Se prepara un medio líquido conteniendo 5 g por litro de Bacto-Casitone, una fuente comercial de nitrógeno asimilable que comprende un digesto pancreático de caseína, obtenible de Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A., y distribuido en cantidades de 600 ml en matraces de 2,8 litros, a cada uno de los cuales se añaden 45 ml (34,5 g) de n-parafinas C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub> obtenidas de The Continental Oil Company, de New York, N.Y., U.S.A. Después de esterilizar este medio en vapor de agua durante 35 minutos a 1,05 kg/cm<sup>2</sup> relativos, se inocula cada matríz desde un tubo inclinado de agar de dextrosa de patata conteniendo células de Candida lipolytica ATCC 20228 y se incuban aerobicamente a 26-27°C durante 48 horas, utilizando un agitador rotativo. Al término de este tiempo, se transfiere un inóculo al 5 % del crecimiento de Candida a 25. litros de un medio esterilizado acuoso que contiene, por litro, 2,6 g de sólidos de licor de la maceración de maíz, 4 g de sulfato amónico y 15 g de carbonato cálcico, al cual se habían añadido 200 ml (153 g) de las mismas n-parafinas C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>. El medio inoculado se agita durante 53 horas y se airea burbujeando aire, en una proporción de 1,25 litros de aire por mi-

30.



nuto, a una temperatura de 26-28°C.

- Al término de este tiempo, se añaden 270 ml de este medio de inóculo a unos 5 litros de medio esterilizado en un fermentador más grande, conteniendo los siguientes ingredientes por litro: 2 g de urea, 0,4 g de sulfato magnésico heptahidratado, 6 g de carbonato cálcico, 0,75 g de dihidrogenofosfato de potasio, 0,25 mg de hidrocloreuro de tiamina y cantidades de nitrato férrico y sulfatos de zinc, cobre y manganeso para dar 0,15 mg de hierro, 0,5 mg de zinc, 0,125 mg de cobre y 0,01 mg de manganeso. A lo anterior se añaden 980 ml (750 g) de las mismas n-parafinas C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>. El medio de fermentación se agita con una turbina de cuatro paletas a 1.400 rpm y se airea burbujeando aire en una proporción de 3 litros de aire/minuto a 26°C. Durante las primeras 24 horas, el pH se mantiene en 7,25 mediante la adición de amoníaco acuoso. El pH se deja entonces descender a 3,5 a medida que se produce ácido y se mantiene entonces en este valor mediante la adición de amoníaco acuoso.
- (B) Proceso continuo:
- Transcurridas 71 horas, se añade continuamente al fermentador, un medio de la siguiente composición, en una proporción de aproximadamente 2 litros por día (1,4 ml/minuto): 0,4 g/litro de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,75 g/litro de dihidrogenofosfato de potasio, 0,25 mg/litro de hidrocloreuro de tiamina, 0,6 ml/litro de ácido clorhídrico y sales de hierro, zinc, cobre y manganeso para dar 0,3 mg/litro de hierro, 1,0 mg/litro de zinc, 0,25 mg/litro de cobre y 0,02 mg/litro de manganeso. Simultáneamente, se añaden las mismas n-parafinas C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub> en una proporción de aproximadamente 353 ml (270 g) por día (0,25 ml/minuto). Se añade un agente anti-



espumante, Ucon LB-625, en una proporción de 2 ml por día. La velocidad del aire se incrementa a 3,5 litros/minuto, la temperatura se mantiene en 26°C y el pH en 3,5 mediante la adición de amoníaco acuoso. El volúmen del fermentador se deja incrementar a unos 7 litros y, una vez alcanzado este nivel, se deja rebosar el medio al interior de un recipiente.

5.

El material recogido en el recipiente se analiza diariamente por valoración de muestras con álcalis, para determinar la acidez libre y de nuevo, después de la adición de formaldehído, para determinar el ácido que ha sido neutralizado por el amoníaco. En adición, muestras del recipiente son centrifugadas y el licor claro analizado similarmente con respecto al contenido en ácido, y también específicamente con respecto al ácido cítrico mediante el método de la pentabromoacetona y con respecto a las proporciones de ácidos cítrico e isocítrico mediante cromatografía gas-líquido.

10.

15.

Después de un tiempo total de experimentación de 304 horas (71 horas para el proceso discontinuo más 233 horas para el proceso continuo), la cantidad de ácido cítrico producido resultó ser de 4,248 kg (expresado como monohidrato) a partir de un peso total de 3,337 kg de n-parafinas añadidas, lo que representa un rendimiento global del 127 % en peso. El contenido en ácido cítrico del licor claro procedente del efluente, varió durante el proceso desde 134 a 178 g/litro (de nuevo expresado como monohidrato) y el contenido en ácido isocítrico desde 9,5 a 20 g/litro (expresado como ácido anhidro). La proporción de ácido cítrico en el licor claro varió desde 87 a 92 %, basado en el total de ácidos cítrico e isocítrico anhidros.

20.

25.

30.

El material hidrocarbonado utilizado en el ejemplo 1,



tenía la siguiente composición:

414831

5.	n-alcanos - C<14	0,0
	C 14	8,4
	C 15	64,9
	C 16	21,5
	C 17	4,1
	C 18	0,7
	C>18	0,2
		<hr/>
		99,8
	otros hidrocarburos	0,2
		<hr/>
10.		100,0

EJEMPLOS 2 Y 3

Se repite el método del ejemplo 1, pero utilizando materiales hidrocarbonados que consisten principalmente en (a) n-parafinas C<sub>14</sub>-C<sub>17</sub> obtenidas a partir de British Petroleum Company Limited, de Londres, Inglaterra y (b) n-parafinas C<sub>16</sub> - C<sub>19</sub> obtenidas de Texaco Inc., Petrochemicals Department, de New York, U.S.A., respectivamente, con resultados similares.

Estos materiales tenían las siguientes composiciones:

	(a)		(b)	
20.	n-alcanos - C<13	0,1	-	
	C13	3,9	C<14	0,2
	C14	20,8	C14	0,6
	C15	32,7	C15	2,8
	C16	27,1	C16	12,4
	C17	13,9	C17	30,8
	C18	0,9	C18	34,1
25.	C>18	0,0	C19	14,0
		-	C20	1,9
		<hr/>	C>20	0,5
		99,4		97,3
	otros hidrocarburos	0,6		2,7
		<hr/>		<hr/>
30.		100,0		100,0



En cada uno de los ejemplos anteriores, el pH del medio, durante el proceso continuo, se mantuvo en 3,5 y la temperatura del medio en 26°C.

EJEMPLOS 4 A 7

5. Se repite el método del ejemplo 1, pero manteniendo el pH del medio, durante el proceso continuo, en los valores indicados en la siguiente tabla, con los resultados mostrados:

<u>Ejemplo</u>	<u>pH</u>	<u>Rendimiento en ácido cítrico</u>
4	2,8	ligeramente reducido
10. 5	3,0	" "
6	3,2	similar
7	4,0	reducido

\* comparado con el rendimiento a pH 3,5.

EJEMPLOS 8 A 11

15. Se repite el método del ejemplo 1, pero la temperatura del medio se mantiene, durante el proceso continuo, a las temperaturas mostradas en la siguiente Tabla, con los resultados indicados:

<u>Ejemplo</u>	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Velocidad de producción de ácido cítrico*</u>
20. 8	22	más lenta
9	24	"
10	28	similar
11	30	"

\* con relación a la velocidad de producción a 26°C.

NOTA

25. Describa suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento

30.



5. corresponde a una solicitud de patente presentada en Inglaterra con el nº 23.579/72 de 19 de mayo de 1.972, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO CONTINUO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO CITRICO; caracterizándose por lo siguiente:
10. 1.- Procedimiento continuo para la producción de ácido cítrico, caracterizado porque comprende fermentar aerobícamente un medio acuoso que contiene hidrocarburo dispersado en el mismo como fuente principal de carbono asimilable con un microorganismo acumulador de ácido cítrico; alimentar continuamente el medio de fermentación, hidrocarburo y nutrientes esenciales para el microorganismo; extraer continuamente medio que
15. contiene ácido cítrico en una proporción tal que se mantenga el medio de fermentación en un volumen practicamente constante; mantener el pH del medio de fermentación en un valor del orden de 2,2 a 4,0 y la temperatura del medio de fermentación en
20. un valor del orden de 22 a 32°C; y recuperar ácido cítrico del medio extraído.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo acumulador de ácido cítrico es una levadura del género Candida.
25. 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la levadura es de la especie Candida lipolytica.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la levadura es la cepa Candida lipolytica ATCC - 20228.
30. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindi-

414831



caciones anteriores, caracterizado porque el hidrocarburo consiste esencialmente en uno o más alcanos ó 1-alquenos de cadena recta de 9 a 19 átomos de carbono.

5. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el hidrocarburo consiste en n-alcanos que contienen de 12 a 16 átomos de carbono.

7.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el hidrocarburo consiste en n-alcanos que contienen de 14 a 19 átomos de carbono.

10. 8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el pH del medio se mantiene en un valor del orden de 2,8 a 3,5.

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque el pH se mantiene entre 3,2 y 3,5.

15. 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el pH se mantiene en la gama deseada mediante adición de amoníaco gaseoso o acuoso.

20. 11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la temperatura del medio se mantiene en la gama de 26 a 30°C.

12.- Procedimiento continuo para la producción de ácido cítrico, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

25. Esta Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 27 MAYO 1973

PFIZER CORPORATION.

J. GOMEZ ACEBO Y MUÑOZ  
c/ P. Elmadari L. Gorta Forastades

R