

418914



P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para todo el territorio nacional, a favor del Patronato de Investigación Científica y Técnica "Juan de la Cierva" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con domicilio en calle de Serrano 150, Madrid. (Inventor: Dr. D. J. Garrido Márquez) por un "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según la siguiente

MEMORIA DESCRIPTIVA

El Patronato de Investigación Científica y Técnica



"Juan de la Cierva" tiene una Patente para la "OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS", utilizando una cepa de *S. cheresiensis*; dado el gran interes de este tema al agravarse, en todo el mundo, la deficiencia de proteínas y como continuación de los trabajos que dieron lugar a dicha Patente, se ha estudiado en el Instituto de Fermentaciones Industriales la selección de otras especies de levaduras capaces de multiplicarse sobre etanol con rendimientos rentables. Además se ha estudiado las condiciones más idóneas para la producción de dichas levaduras en proceso continuo.

En el trabajo objeto de la Patente que se solicita, se ha efectuado una selección de distintas especies de levaduras (pertenecientes a la Colección del Instituto de Fermentaciones Industriales. Las levaduras utilizadas en este trabajo de selección pertenecen a cuatro grupos distintos:

-Levaduras de "flor" caracterizadas por reproducirse sobre altas concentraciones de etanol dado su elevado nivel de alcohol deshidrogenasa (una de estas especies se utiliza en la Patente n° 407.704, y en las patentes n° 313.852 y n° 342.351). En estos ensayos de selección se han empleado las especies *S. cheresiensis*, *S. béticus*, *S. montuliensis* y *S. rouxii*.

-Levaduras de panadería, empleandose distintas cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.

-Especies utilizadas, generalmente con éxito, en otros procesos de multiplicación de levadura sobre diferentes sustratos. Se han utilizado las especies *Hansenula anomala* (cepa 33) *Candida utilis* y *Rhodotorula Glutinis*.



Todas las especies empleadas utilizan totalmente el etanol con rendimientos aceptables. Entre ellas pueden destacarse las especies *S. cheresiensis* (cepa V-24), *S. cerevisiae* (cepa p-11), *R. glutinis* (cepa 1416) *Cándida utilis* (cepa 1256) y *Hansenula anómala* (cepa -926) con las que se obtienen rendimientos de levaduras seca entre 50 y 80%.

Estas especies de levaduras presentan notables ventajas en su multiplicación para la producción de proteínas, ya que se obtiene levadura de una gran pureza y características muy estables lo mismo en cultivo discontinuo que en proceso continuo.

En proceso continuo se consigue producir entre 6 g/l y 40 gramos de levadura por litro, según la concentración de etanol utilizado y las restantes condiciones del proceso.

45 MODO DE OPERAR

Para el proceso de producción de levadura a partir de etanol en cultivo continuo, se utiliza una de las especies citadas (*H. anomala*, *Cándida utilis*, *S. cheresiensis*, *R. glutinis*). Estas cepas se conservan sobre estria de agar-malta, en tubo de ensayo, a baja temperatura.

A partir de estas pátinas, la especie a utilizar en cada caso se siembra sobre agar-malta en frascos-Roux que se mantienen para su desarrollo en estufa a 26-28°C. Después de un tiempo de cultivo de 1-4 días, las células así desarrolladas, suspendidas en agua esteril, se emplean como inóculo para los cultivos en fermentador.

El medio de cultivo, empleado en estos procesos continuos, contiene sales minerales para aportar fósforo y magnesio y sulfato amónico y urea como fuente de nitrógeno. Como aporte



60 de factores de crecimiento se emplean soluciones sintéticas o
semisintéticas, que contengan vitaminas, oligoelementos, aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, en cantidad suficiente para que no exista ningún factor limitante del desarrollo. A este medio de cultivo se añade el etanol (en concentración de 0,5
65 a 5%) que constituye la principal fuente de carbono en estos procesos continuos de obtención de levaduras.

Por tanto, dicho procedimiento de obtención de levadura se lleva a cabo sobre un medio de cultivo que contiene: de 0,02 a 0,2% de fosfato monopotásico, de 0,02 a 0,2% de sulfato amónico y urea, de 0,01 a 0,1% de sulfato magnésico y de 0,1 a
70 10ml % de la solución que aporte factores de crecimiento.

El cultivo se realiza en fermentadores de acero inoxidable, capaces de producir una agitación, aireación y temperatura óptima para el procedimiento.

75 Una vez inoculado el fermentador con las células procedentes de la pátina crecida sobre agar-malta, el cultivo se mantiene hasta que el microorganismo se halla en fase logarítmica de crecimiento. En este punto se conecta el fermentador al dispositivo que suministra nuevo medio de cultivo y se procede a dar
80 salida al cultivo obtenido. El flujo se regula hasta obtener la relación más apropiada para un rendimiento óptimo de este proceso de cultivo continuo.

El flujo de entrada del medio de cultivo y de salida del cultivo, ha de ser tal que permita la multiplicación de levadura al ritmo deseado con total utilización de las fuentes de N
85 (urea y sulfato amónico) y carbono-etanol).

La multiplicación de levadura lograda dependerá, por tanto, de la concentración de etanol, de la aireación, de la agi



90 tación, de la temperatura del cultivo y del flujo que se manten
ga en el proceso continuo.

La fijación de estos parámetros es indispensable para el normal desarrollo de la levadura y la conservación de sus características.

95 Una aireación de 200-500 cc de aire por litro de medio de cultivo y por minuto se considera eficaz para obtener un buen rendimiento. La temperatura del cultivo se mantendrá entre 25 y 40°C según la especie de levadura utilizada.

Además de establecer los parámetros citados respecto al proceso de cultivo continuo, es indispensable utilizar la especie de levadura más apropiada teniendo en cuenta las posibles aplicaciones a que se destine la masa de levadura producida.

100 La levadura una vez obtenida, se recupera por centrifugación, se purifica por un lavado, sufre o no proceso de plasmolisis y se somete a un proceso de desecación de acuerdo con los fines a que ha de ser destinada.

REIVINDICACIONES

110 Se reivindica como de nueva y propia invención la propiedad y explotación exclusiva de:

1) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", caracterizado por que para el proceso de producción de levadura, se utiliza una de las especies llamada H. anomala, Candida utilis, S. cheresiensis, R.glutinis. Estas cepas se conservan sobre estria de agar-malta, en tubo de ensayo, a baja temperatura.



2) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según reivindicación 1, y caracterizado también porque a partir de estas patinas, la especie a utilizar en cada caso se siembra sobre agar-malta en frascos-Roux que se mantienen para su desarrollo en estufa a 26-28°C. Después de un tiempo de cultivo de 1-4 días, las células así desarrolladas, suspendidas en agua esteril, se emplean como inóculo para los cultivos en fermentador.

3) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado también porque el medio de cultivo, empleado en estos procesos continuos, contiene sales minerales para aportar fósforo y magnesio y sulfato amónico y urea como fuente de nitrógeno. Como aporte de factores de crecimiento se emplean soluciones sintéticas o semisintéticas, que contengan vitaminas, oligoelementos, aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, en cantidad suficiente para que no exista ningún factor limitante del desarrollo. A este medio de cultivo se añade el etanol (en concentración de 0,5 a 5%) que constituye la principal fuente de carbono en estos procesos continuos de obtención de levaduras.

4) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según reivindicaciones 1, 2 y 3, y caracterizado también porque se lleva a cabo sobre un medio de cultivo que contiene: de 0,02 a 0,2% de fosfa



to monopotásico, de 0,02 a 0,2% de sulfato amónico y urea, de 0,01 a 0,1% de sulfato magnésico y de 0,1 a 10 ml % de la solución que aporte factores de crecimiento.

150 El cultivo se realiza en fermentadores de acero inoxidable, capaces de producir una agitación, aireación y temperatura óptima para el procedimiento.

155 5) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, y caracterizado también porque una vez inoculado el fermentador con las células procedentes de la pátina crecida sobre agar-malta, el cultivo se mantiene hasta que el microorganismo se halla en fase logarítmica de crecimiento. En este punto se conecta el fermentador al dispositivo que suministra nuevo medio de cultivo y se procede a dar salida al cultivo obtenido. El flujo se regula hasta obtener la relación más apropiada para un rendimiento óptimo de este proceso de cultivo continuo.

165 6) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5, y caracterizado también porque el flujo de entrada del medio de cultivo y de salida del cultivo, ha de ser tal que permita la multiplicación de levadura al ritmo deseado con total utilización de las fuentes de N (urea y sulfato amónico) y carbono-etanol.

170 La multiplicación de levadura lograda dependerá, por tanto, de la concentración de etanol, de la aireación, de la agitación, de la temperatura del cultivo y del flujo que se manten



175 ga en el proceso continuo.

7) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", según reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y caracterizado también porque una
180 aireación de 200-500 cc de aire por litro de medio de cultivo y por minuto se considera eficaz para obtener un buen rendimiento . La temperatura del cultivo se mantendrá entre 25 y 40°C según la especie de levadura utilizada.

8) "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS. SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS MAS APROPIADAS. PRODUCCION EN PROCESO CONTINUO", tal y como se
185 describe en el cuerpo de esta memoria y reivindicaciones que consta de 8 páginas escritas por una sola cara.

Madrid, 20 Septiembre 1.973