

430304

430304  
23 SET. 1974

P.- 58.513

HOE 73/P300

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.:

C12C

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

con domicilio en 6230 Frankfurt/Main 80, República Federal  
Alemana.

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LEVADURA"  
(Clase Internacional C12c)

prioridad reivindicada República Federal Alemana, 28 de  
Septiembre de 1973, N° P 23 48 753.8

Se conocen procedimientos biosintéticos en los cuales se reproducen por fermentación microorganismos, por ejemplo determinadas cepas de levadura, en un medio nutritivo sintético, que como único manantial de carbono contiene n-parafinas. Dichos procedimientos se pueden llevar a cabo tanto de modo discontinuo como también de modo continuo. Las parafinas utilizadas en este caso tienen en general 8 a 23 átomos de carbono. Las células de levadura obtenidas de este modo contienen en la llamada "proteína bruta" (que se calcula multiplicando el valor para el nitrógeno, encontrado mediante análisis elemental, por el factor empírico 6,25) usualmente 60 a 80% en peso de aminoácidos y 8 a 12% en peso de ácidos nucleínicos. No obstante, una proporción tan elevada de ácidos nucleínicos es indeseable, ya que a partir de ellos se forma en el organismo humano ácido úrico, que provoca artritis. Además de ellos se influye desfavorablemente sobre la flora del tracto gastrointestinal.

Se ha encontrado ahora un procedimiento para la preparación de levaduras con una n-parafina con 8 a 23 átomos de carbono como manantial de carbono y un manantial de nitrógeno en condiciones aerobias con un valor de pH entre 2,0 y 6,8, que está caracterizado porque se fermentan cepas de levadura de la familia Candida, sus mutantes o variantes, de manera tal que la concentración de n-parafina

fina en la fase del crecimiento logarítmico de las células de levadura se encuentra entre 0,04 y 0,12% en peso, referido a la suspensión de cultivo.

5 Se prefiere una concentración de las n-parafinas que se encuentra entre 0,08 y 0,10% en peso, así como la utilización de las n-parafinas que tienen 10 a 14 átomos de carbono en la cadena.

10 El procedimiento se lleva a cabo convenientemente en recipientes de fermentación que contienen un medio nutricional, el cual además de las n-parafinas mencionadas contiene, en calidad de manantial de nitrógeno, sales tales como nitrato de potasio, sulfato de amonio o amoníaco, urea o harina de soja. Además de ello, el medio nutricional contiene fosfatos tales como dihidrogenofosfato potásico  
15 o hidrogenofosfato disódico así como sales de magnesio y potasio y elementos traza, tal como los que están contenidos también en agua corriente.

Puede ser conveniente añadir, especialmente a los cultivos previos, sustancias nutricias tales como extracto  
20 de levadura, extracto de carne, glucosa, tiamina u otras.

El procedimiento se lleva a cabo convenientemente a temperaturas entre 20° y 35°, preferiblemente entre 28° y 32°.

25 Como cepas de levadura se utilizan especies de Candida especialmente cepas de Candida tan conocidas tales

como lipolytica<sup>1)</sup> o guilliermondii<sup>2)</sup>, pero también cepas tan poco descritas como parapsilosis<sup>3)</sup> o tan raras como viswanathii<sup>4)</sup>.

1) ATCC 20.383;

2) ATCC 20.382;

3) ATCC 20.384;

4) ATCC 20.385;

5

10

15

20

25

La suspensión de cultivo en el recipiente de fermentación es aireada con 0,3 a 1,5 litros de aire por litro de solución de cultivo y por minuto (vvm), preferiblemente con 0,9 a 1,1 vvm. Con el fin de garantizar una buena absorción del oxígeno por las células se agita convenientemente de modo intenso; pueden añadirse también emulsionantes. Con el fin de lograr un buen intercambio de todos los componentes en el sistema de 4 fases célula-solución salina-parafina-aire, se ha manifestado como conveniente utilizar un agitador o mejor todavía dos o más agitadores, en un recipiente de fermentación, cuyos números de revoluciones se encuentran entre 100 y 250 rpm, preferiblemente entre 150 y 200 rpm. Además de ello es ventajoso disponer en el recipiente de fermentación dos agitadores, especialmente agitadores de turbina, de manera tal que las distancias entre agitadores sean aproximadamente de un diámetro de agitador. La proporción de diá-

metro de agitador a diámetro de recipiente se encuentra de modo conveniente entre 0,35 y 0,65, preferiblemente entre 0,45 y 0,55. La velocidad de circulación de la sus pensión de cultivo es convenientemente mayor de 7 metros/segundo.

5

Caso de que se produzca formación de espuma, se aconseja una represión química o mecánica de dicha espuma, por ejemplo por adición de 0,01 a 0,1 % en peso de un agente desespumante tal como octanol, ésteres de ácido oleico y de ácido láurico con glicol, glicerina o sorbita, solución alcohólica de colesteroína, o siliconas como poli dimetilsiloxano.

10

La concentración de n-parafina entre 0,04 y 0,12 % en peso, preferiblemente entre 0,08 y 0,10 % en peso, puede ser gobernada de modo continuo mediante diferentes medidas, tal como por ejemplo mediante medición del consumo de nitrógeno, de la proporción de masa de células, o preferiblemente por medición de la descarga de dióxido de carbono. En este caso es posible una dosificación con precisión de la adición de parafina reaccionando rápidamente a una descarga de dióxido de carbono en disminución en el caso de déficit de carbono.

15

20

Cuando el valor de pH de la suspensión de cultivo disminuye por debajo del valor prescrito, es llevado nuevamente a dicho valor prescrito por adición de un álca-

25

li, por ejemplo lejía de sosa o lejía de potasa.

5 Para controlar el proceso se toman muestras de la suspensión de cultivo, con el fin de determinar el peso en seco y el contenido de nitrógeno en la masa de células de levadura. Después de ello se pueden determinar el grado de crecimiento y el tiempo de duplicación de la masa de células. Cuando el peso en seco de la levadura ya no aumenta logarítmicamente en tomas de muestras sucesivas, se hace terminar la fermentación.

10 La separación de la masa de levadura se efectúa de modo usual por decantación o preferiblemente por centrifugación, lavando varias veces con agua. De esta manera se obtiene una masa de células de levadura a modo de pasta, que todavía contiene 75 a 90% en peso de agua. El secado  
15 puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo mediante secado con rodillos, secado con lecho fluidificado o secado por atomización. El producto secado de este modo contiene solo 2 a 5% en peso de agua y 45 a 60% en peso de proteína bruta. En esta proteína bruta la proporción de aminoácidos es de 90 a 95% en peso. En este caso es digno  
20 de mención el hecho de que no sólo esta proporción de aminoácidos en general, sino especialmente el contenido de aminoácidos esenciales y semiesenciales, son mayores que en productos comparables de acuerdo con el estado conocido de la técnica. Además de ello, el contenido de cenizas  
25

brutas de la masa de células secada obtenida de acuerdo con el invento es claramente menor que el de los productos conocidos. La proteína bruta obtenida de acuerdo con el invento contiene además solo 3 a 6% en peso de ácidos nucleínicos, mientras que los productos de levadura conocidos contienen 8 a 12% en peso de ácidos nucleínicos.

La masa de levadura seca obtenida de acuerdo con el procedimiento según el invento es apropiada por lo tanto el grado especial para servir como manantial de proteínas en alimentos y en piensos para animales.

EJEMPLO 1

La cepa *Candida lipolytica* FH-H5027 (ATCC 20.383) que es mantenida en un tubito con agar inclinado de la composición:

15

2,5 % de extracto de carne

5,0 % de extracto de levadura

10,0 % de peptona de carne

10,0 % de glucosa

10,0 % de NaCl

20

2,5 % de agar

25

es lavada con 4 ml de agua destilada o solución fisiológica de sal común y es inoculada de modo estéril en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, que contiene 250 ml de solución nutritiva de cultivo previo con la siguiente composición:

0,53 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,4 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,2 % de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0,02 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,02 % de KCl

1,5 % de n-parafina y

0,1 % de elementos traza (pH 5,5)

El procedimiento de acuerdo con el invento se lleva a cabo en un recipiente de fermentación con una capacidad de 14 litros, que está cargado con 10 litros de la solución nutritiva siguiente:

1 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,4 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,2 % de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0,02 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,02 % de KCl

El valor del pH de la solución nutritiva es de 4,0. Esta es esterilizada a 121° C durante 45 minutos. Además de ello se esterilizan separadamente 300 g (3 % en peso) de n-parafina con 10 a 14 átomos de carbono. Antes de la inoculación del cultivo principal se añade a la solución nutritiva 1% en peso de n-parafina.

Para inocular la solución nutritiva se utilizan en condiciones estériles 2 veces 250 ml de cultivo previo, que había sido agitado a 28°C durante 48 a 72 horas. La solución nutritiva inoculada de este modo es agitada con un agitador de turbina durante 48 a 64 horas a 28°C aireando con 1 vvm de aire.

Una corrección del valor del pH se efectúa en caso necesario mediante adición de NaOH 2N estéril. Durante la fase logarítmica de la fermentación se mantiene una concentración de n-parafina entre 0,08 y 0,1% en peso. Para ello, en el caso de una disminución de la descarga de CO<sub>2</sub> de las células se añaden dosificadamente de modo automático porciones adicionales de n-parafina hasta que vuelve a aumentar de nuevo la descarga de CO<sub>2</sub>.

El progreso del proceso es controlado mediante tomas de muestras para determinar el peso en seco y el nitrógeno de la masa de células de levadura.

Una vez terminada la fase de crecimiento logarítmico se lleva a cabo el tratamiento de modo usual, por centrifugación, lavado de las células con agua y subsiguiente secado por atomización. El producto así obtenido tiene un contenido de proteína bruta de 56,7 % en peso, un contenido de aminoácidos de 54,9% en peso y una proporción de ácido nucleínico de 3,5% en peso. Los aminoácidos esenciales y semiesenciales constituyen solo 49,89% en pe

so (con glicina 54,34% en peso). Datos detallados se encuentran en la siguiente Tabla 1.

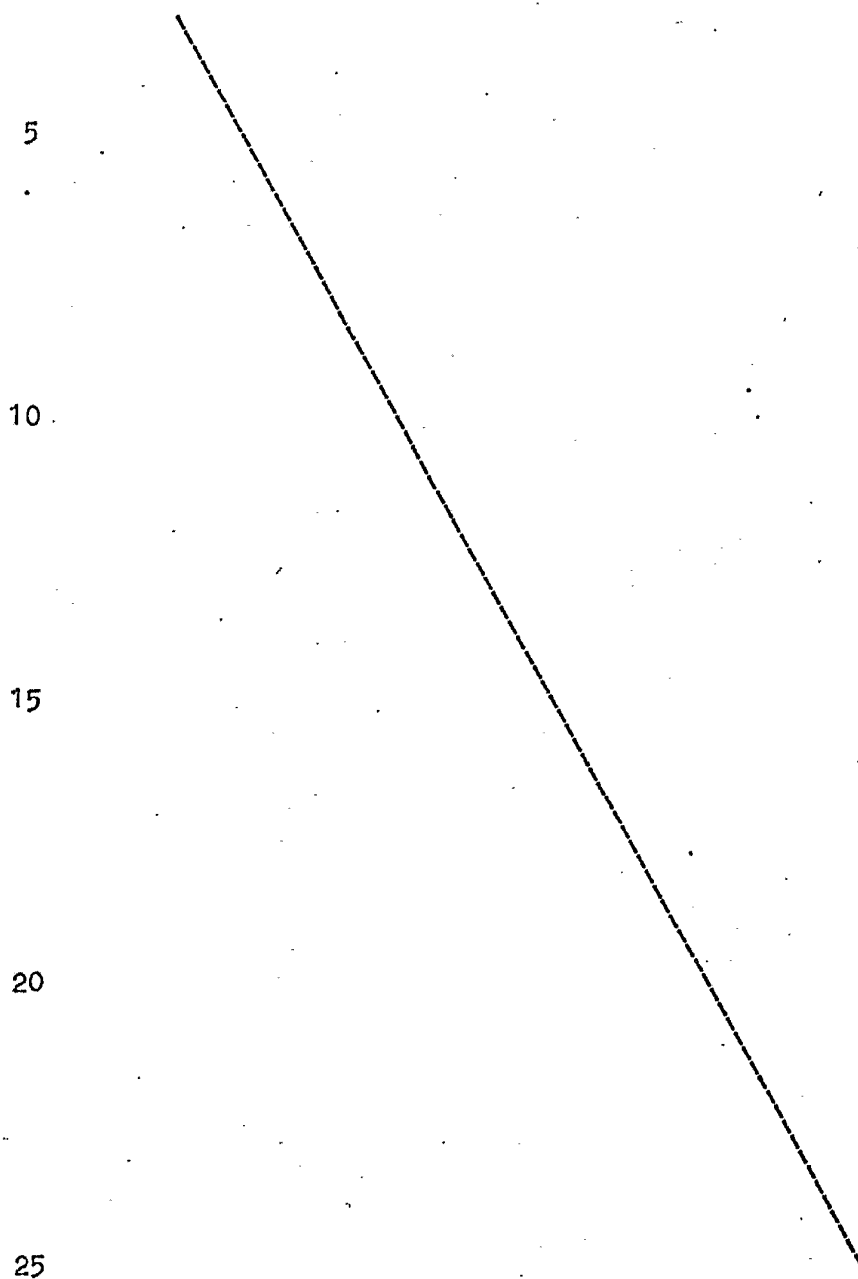


TABLA 1

Producto		Candida lipolytica FH-H-5027
5	Proteína bruta (N x 6,25) %	56,7
	Contenido de agua %	2,9
	Cenizas brutas %	4,54
	Grasas brutas %	8,25
	Fibras brutas %	2,93
10	Contenido de aminoácidos %	54,9
	Aminoácidos g/16 g de N	
	Asp	11,35
	Thr	5,73
	Ser	5,54
	Glu	10,92
	Pro	4,34
	Gly	5,59
	Ala	6,88
	Cys	0,58
	Val	5,82
	Met	1,54
	Ile	5,05
	Leu	7,70
	Tyr	3,65
	15	Phe
His		4,94
Lys		9,25
Arg		4,92
Try		0,54
20	Vitaminas mcg/g	
	B <sub>1</sub>	4,55
	B <sub>2</sub>	42,0
	B <sub>6</sub>	27,0
	B <sub>12</sub>	0,11
Nicotinamida	130,0	
Acido pantoténico	99,0	
Contenido de ácido nucleí nico %	3,5	
Contenido de cenizas bru- tas %	4,54	
25		

### EJEMPLO 2

La cepa *Candida viswanathii* FH-H-5123 (ATCC 20.385) es cultivada como en el Ejemplo 1. Además de ello a un recipiente de fermentación con una capacidad de 14 litros se añaden 9 litros de solución nutritiva con la composición indicada en el Ejemplo 1 y se agrega 0,5% en peso de parafina esterilizada. La solución nutritiva es inoculada como en el Ejemplo 1 y es agitada a 30°C, aireando con 1 vvm de aire con un agitador de turbina con 250 rpm. El valor del pH es mantenido en pH 4,0 eventualmente por adición de lejía de sosa estéril. Durante la fase logarítmica de la fermentación se mantiene una concentración de n-parafina entre 0,08 y 1,0 % en peso. La regulación de esta concentración, el control del proceso así como la separación y el tratamiento de la masa de células obtenida se efectúan tal como se describe en el Ejemplo 1. Después de secado por atomización se obtiene un producto con un contenido de proteína bruta de 46,6 % en peso, un contenido de aminoácidos de 42,0% en peso y un contenido de ácidos nucleínicos de 4,1 % en peso. El contenido de cenizas brutas es de 3,05 % en peso.

### EJEMPLO 3

La cepa *Candida parapsilosis* FH-H-5356 (ATCC 20.384) es cultivada tal como se describe en el Ejemplo 1, en primer termino en un recipiente de fermentación con una capa

cidad de 10 litros. La suspensión de cultivo así obtenida es transferida luego a un recipiente de fermentación de 200 litros de capacidad, que está cargado con 150 litros de la siguiente solución nutritiva:

5

1 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,4 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,2 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

10

0,2 % de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0,02 % de  $\text{NaCl}$

0,02 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 % de n-parafina ( $\text{C}_{10}\text{-C}_{14}$ )

15

El valor del pH de la solución nutritiva es ajustado a 5,0 con ácido fosfórico semiconcentrado. A continuación se esteriliza a 120°C y 1,4 atmósferas manométricas durante 20 minutos. Después de la esterilización el valor del pH es de 4,5 a 5,0.

20

A continuación el cultivo es fermentado durante 40 a 48 horas a 28°C aireando con 1,1 vvm a una presión de 0,3 atmósferas manométricas y agitando con 2 agitadores con 250 rpm. Durante la fase logarítmica de la fermentación se mantiene una concentración de n-parafina en

25

tre 0,08 y 0,1% en peso, añadiendo, en el caso de una  
disminución de la descarga de dióxido de carbono, porcio-  
nes adicionales de n-parafina hasta que vuelve a subir  
la descarga de dióxido de carbono. El valor del pH es  
5 mantenido entre 3,5 y 4,0 por adición de lejía de sosa  
estéril. El progreso del proceso y el momento de su ter-  
minación son determinados tal como se indica en el Ejem-  
plo 1.

La suspensión de cultivo obtenida de este modo  
10 es utilizada como material de inoculación para un reci-  
piente de fermentación de 2000 litros de capacidad. La so-  
lución nutritiva tiene la misma composición y el mismo va-  
lor de pH que precedentemente se han indicado para la fer-  
mentación que se acaba de mencionar. El recipiente de fer-  
15 mentación es esterilizado durante 20 minutos a 120°C y  
1,4 atmósferas manométricas, agitando con 210 rpm. Después  
de la esterilización el valor del pH es de 4,0 a 4,5.

La subsiguiente fermentación se lleva a cabo a  
28°C, aireando con 1,0 vvm, a una presión de 0,3 atmósfe-  
20 ras manométricas y con 2 agitadores con 210 rpm. El valor  
de pH es mantenido entre 3,0 y 4,5 durante la fermenta-  
ción con lejía de sosa estéril.

El progreso del proceso es vigilado mediante to-  
mas de muestras para comprobar la esterilidad, para medir  
25 el pH, para determinar el peso en seco y el nitrógeno de

la masa de células de levadura.

La concentración de n-parafina es mantenida, durante la fase de crecimiento logarítmico, entre 0,08 y 0,1% en peso y es repuesta tal como precedentemente se describe a medida que varía la descarga de dióxido de carbono.

Después de terminada la fase de crecimiento logarítmico se calienta a 55°C durante corto tiempo la suspensión de cultivo, y luego se la enfría a 18°C. El valor de pH se encuentra entre 3,5 y 4,5.

1850 litros de la suspensión de cultivo así obtenida, con un contenido de 23 g por litro de masa seca, son centrifugados en una centrífuga de tornillo sin fin con envolvente plena a 4450 veces la gravedad con un caudal de 1060 litros/hora. Las células de levadura húmedas separadas de este modo son sumergidas en agua desalinizada para formar una suspensión con un contenido de 10 a 15% en peso de masa seca y son agitadas vigorosamente en un recipiente apropiado a 15 hasta 18°C. En este caso, durante aproximadamente una hora se separan por lavado impurezas, sustancias acompañantes y componentes de la solución nutritiva. Después de efectuar nuevamente centrifugación, se produce con agua desalinizada una suspensión de levadura al 20 hasta 25% en peso, se agita ésta en las mismas condiciones y se centrifuga de nuevo. Las células

de levadura lavadas de este modo son sumergidas para formar una suspensión al 40 hasta 50% en peso y son sometidas al secado por atomización.

5 Se obtienen de este modo 36 Kg de un producto celular claro, que huele débilmente a levadura, que contiene 47,9 % en peso de proteína bruta, 43,6 % en peso de aminoácidos - de éstos 57,8 % en peso de aminoácidos esenciales- además 3,9% en peso de ácidos nucleínicos y 3,7 % en peso de cenizas brutas.

10 EJEMPLO 4

La cepa *Candida guilliermondii* FH-H-5151 (ATCC 20.382) es fermentada, tal como se describe precedentemente en el Ejemplo 3, en un recipiente de fermentación de 2000 litros de capacidad, en 1900 litros de suspensión de cultivo. El procedimiento se lleva a cabo tal como se describe en el Ejemplo 3. Se obtienen 38 Kg de un producto celular que huele débilmente a levadura, que contiene 48,8 % en peso de proteína bruta, 45,1% en peso de aminoácidos y 3,6% en peso de ácidos nucleínicos. El contenido de cenizas brutas era de 3,5% en peso.

15

20

## REIVINDICACIONES

5

1a.- Procedimiento para la preparación de levadura con una n-parafina con 8 a 23 átomos de carbono en calidad de manantial de carbono y un manantial de nitrógeno, en condiciones aerobias con un valor de pH entre 2,0 y 6,8, caracterizado porque se fermentan cepas de levadura de la familia Candida, sus mutantes o variantes de manera tal que la concentración de n-parafina en la fase del crecimiento logarítmico de las células de levadura se encuentra entre 0,04 y 0,12% en peso, referido a la suspensión de cultivo.

2a.- Procedimiento según la reivindicación 1a, caracterizado porque la concentración de n-parafinas se encuentra entre 0,08 y 0,1 % en peso.

3a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1a y 2a, caracterizado porque en calidad de manantial de carbono se utilizan n-parafinas con 10 a 14 átomos de carbono.

4a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1a a 3a, caracterizado porque la suspensión de cultivo es

aireada con 0,3 a 1,5 volúmenes de aire por volumen de suspensión y por minuto.

5 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque la suspensión de cultivo es agitada con 100 hasta 250 revoluciones por minuto.

10 6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un recipiente que contiene por lo menos 2 agitadores de turbina, encontrándose la proporción del diámetro de agitador al diámetro de recipiente entre 0,35 y 0,65 y siendo la distancia entre dos agitadores la de un diámetro de agitador.

15 7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan *Candida lipolytica* FH-H-5027 (ATCC 20.383) y sus mutantes o variantes.

20 8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan *Candida viswanathii* FH-H-5123 (ATCC 20.385) y sus mutantes o variantes.

25 9ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan *Candida parapsilosis* FH-H-5356 (ATCC 20.384) y sus mutantes o variantes.

10ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque se utilizan Candida guilliermondii FH-H5151 (ATCC 20.382) y sus mutantes o variantes.

5

11ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LEVADURA".

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

10

Esta Memoria consta de diez y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,  
P.A.

23 SET. 1974

15

Alberto de Elizaburu  
Por Poderes

20-9-74

- 19 -

e.c.v.