

43485424 MAR. 1975

P.- 59.767

3301/Sv/Z/8510

Int Cl.<sup>a</sup> C12P 21/00, D21C 11/02 // C12R 1:72

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.<sup>a</sup> C 12 D

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOL OGI CKÁ

entidad checoeslovaca

con domicilio en Praga, Checoslovaquia

por: "UN METODO DE PRODUCIR PROTEINAS DE  
FERMENTACION"

(Clase Internacional A23k)

- 1 -

17.3.75

La presente invención se refiere a un método para producir proteínas de fermentación a partir de líquidos residuales del método de sulfito y de productos solubles de recuperación de desperdicios de la destilación de alcohol.

5

Como es sabido, los líquidos residuales del método del sulfito (pasta de papel), los líquidos de lavado, o los productos solubles de recuperación de desperdicios que quedan después de la producción de alcohol por fermentación, se han empleado durante varias décadas como materia prima básica para la producción de proteínas microbianas o de fermentación. Hasta ahora, sin embargo, el rendimiento de producción ha estado siempre limitado por las proporciones de líquidos agotados, hidratos de carbono, así como otras sustancias carbonosas asimilables, tales como, por ejemplo, ácido acético, contenidas en los mismos. Por consiguiente, la producción de las proteínas de fermentación ha dependido por completo de la producción de celulosa y los respectivos procedimientos de cocción de la madera. Por estas razones, se ha encontrado económico disponer instalaciones productoras de proteínas sólo en fábricas de pasta de madera de alta producción, pero incluso en estos casos no ha podido hacerse óptima la capacidad de producción. Como se ha expuesto ya anteriormente, la producción de proteínas ha dependido de la proporción de sustancias

10

15

20

25

carbonosas asimilables a tratar, que son, por encima de to  
do, hidratos de carbono. Esta proporción ha estado determini  
nada, no sólo por el procedimiento particular de cocción  
de la madera, sino también por su calidad. Como la obten-  
5 ción de celulosa ha constituido siempre el interés funda-  
mental de los productores, la composición del substrato nu-  
tricio básico para el cultivo de levaduras, y por consi-  
guiente la producción de proteínas de fermentación, han va-  
riado de manera indeseable, por regla general. Los líquidos  
10 agotados de sulfito que quedan tras la fermentación de mi  
croorganismos productores de proteínas se caracterizan por  
un contenido relativamente elevado de sustancias solubles,  
predominantemente orgánicas (a saber de aproximadamente 10  
por ciento), con lo que ha quedado una única posibilidad  
15 de eliminación de las mismas, a saber su densificación e  
incineración. De este modo pueden haberse eliminado por  
completo los líquidos residuales.

Recientemente, se ha observado un desarrollo pro  
gresivo de la producción de proteínas microbianas a partir  
20 de materias primas sintéticas, basadas por ejemplo, de mo  
do particular, en petróleo crudo. Uno de estos materiales  
clave es el etanol sintético, cuya ventaja, a diferencia  
de los materiales de hidrocarburos, reside en su miscibi-  
lidad con agua, así como en que el etanol es un producto  
25 intermedio usual en el ciclo de procedimientos de fermen-

tación de sacáridos. Para la explotación de esta materia prima básica se han propuesto muchos métodos, basados en su mayoría en el empleo de una cepa específica de levadura, o en una adaptación de esta cepa, para aprovechar el etanol con el mejor rendimiento posible. Así, por ejemplo, el método descrito en la memoria descriptiva de la patente checa número 109.658 consiste en una adaptación de la especie CANDIDA UTILLIS para el cultivo en medios que contienen etanol crudo sintético. Asimismo, en la memoria descriptiva de la patente de los Estados Unidos de América número 206.493 se ha desarrollado un cultivo de la especie de levadura HANSENULA ANOMALA en medios etanólicos con un aditivo de un producto de autólisis por fermentación. Se conoce además un cultivo de una serie de microorganismos productores de proteínas sobre productos de oxidación de hidrocarburos, de los que una parte predominante está formada por etanol (véanse, por ejemplo, la memoria descriptiva de la patente francesa número 1.597.233 y la memoria descriptiva de la patente británica número 1.231.058) así como un cultivo de la especie CANDIDA UTILLIS sobre substratos etanólicos puros, para producir preparados comestibles (véase memoria descriptiva de la patente alemana número 2.154.091). Una desventaja relacionada con la fermentación de medios que contienen etanol reside en la difícil eliminación de los líquidos residuales. Estos líquidos tie

nen que purificarse por degradación biológica, procedimiento que es relativamente caro, representando su costo aproximadamente el 10 por ciento del presupuesto de una fábrica de levaduras. A causa del contenido relativamente pequeño de sustancias combustibles en estos líquidos residuales, no puede ni siquiera pensarse en el segundo método de eliminación, es decir su densificación e incineración.

Para eliminar, o al menos disminuir, los inconvenientes de la técnica anterior tal como se han expuesto, particularmente las variaciones en la composición del substrato nutricional básico para la levadura, y en la fermentación de medios alcohólicos, es decir la necesidad de tratamiento biológico de líquidos residuales, se proporciona un método para producir proteínas de fermentación a partir de líquidos residuales de sulfito y productos solubles de recuperación de desperdicios de la fabricación de alcohol, método que, según la invención, consiste en que, en primer lugar, se aumenta la proporción de sustancias carbonosas asimilables en la materia prima de sulfito, por medio de un aditivo de etanol, hasta en un 10 por ciento en peso, después de lo cual este material enriquecido se fermenta, en un procedimiento continuo o discontinuo, preferiblemente empleando una sustancia de inoculación previamente cultivada sobre la materia prima de sulfito o sobre medios sintéticos con un contenido de etanol.

Según otra característica de la invención, la pro  
porción original de sustancias reductoras contenidas en la  
materia prima de sulfito, tales como sacáridos, particular  
mente, se disminuye, antes de añadirle etanol, por procedi  
5 mientos microbiológicos, hasta 0,1 por ciento en peso.

El cultivo se efectúa preferiblemente, según la  
invención, usando una levadura consumidora de etanol, y pre  
feriblemente especies esporógenas tales como, por ejemplo,  
CANDIDA UTILIS, CANDIDA UTILIS var. ARBOREA, TORULOPSIS  
10 CANDIDA, CRYPTOCOCCUS ALBIDUS var. DIFFLUENS, o mezclas de  
las mismas.

Si el cultivo se efectúa en un procedimiento con  
tinuo, pueden emplearse procedimientos de dos o más etapas,  
preferiblemente con separación intermedia.

15 El método según la invención permite eliminar las  
limitaciones de capacidad de las instalaciones productoras  
de proteínas en fábricas de pasta de madera, y hacer ópti  
ma su capacidad de producción. Además, el objeto de la in  
vención reside en la posibilidad de una eliminación común  
20 de líquidos residuales, cuya cantidad permite eliminarlos  
por evaporación e incineración el residuo que queda tras  
el tratamiento de los líquidos de sulfito. Así pues, la le  
vadura producida sobre la base de etanol no aumenta la pro  
porción de líquido residual. La biomasa obtenida finalmente  
25 de las dos materias primas básicas es, desde el punto de

vista de valor nutricional, más ventajosa que la levadura producida a partir de líquidos agotados de sulfito no tratados, muy especialmente por su reducido contenido de cenizas y su mayor contenido de proteínas. Otra ventaja reside en la posibilidad de usar la misma capa de levadura, o una carga de un concentrado centrifugado de células cultivadas sobre líquidos residuales de sulfito, para un cultivo simultáneo o posterior sobre etanol.

En principio, la invención permite seguir dos alternativas; en primer lugar, es posible efectuar el cultivo de levadura sobre líquidos agotados de sulfito con una adición de etanol, y, en segundo lugar, sobre líquidos agotados de sulfito fermentados y centrifugados con una adición de etanol e ingredientes nutricios. La última de estas alternativas permite también una recirculación y una reutilización de los líquidos agotados.

La primera alternativa de tratamiento depende de la proporción de sustancias asimilables en los líquidos residuales de sulfito originales, así como de la capacidad de producción del fermentador. La fermentación puede efectuarse continuamente, bien en una sola etapa, o preferiblemente, con capacidades de producción relativamente elevadas y en líquidos de tratamiento que tienen un mayor contenido de sacáridos, en dos o más etapas. En el procedimiento de dos etapas puede incorporarse una separación interme

dia de las células a someter a fermentación.

El procedimiento según la segunda alternativa está determinado sólo por la capacidad de producción del fermentador. En este procedimiento, el líquido residual de sulfito fermentado por medio de la levadura y centrífugado después, asume en realidad la función de un agente diluyente del etanol. Además, el procedimiento dispone un medio fisiológico favorable, aparte de la explotación de un "residuo" de sustancias carbonosas asimilables y de agentes nutricios digeridos de modo incompleto.

Los ejemplos siguientes se dan sólo como ilustrativos, sin limitar, sin embargo, la invención a sus detalles específicos.

15

#### EJEMPLO I

A 10 litros de materia prima de sulfito que queda tras la cocción de madera con bisulfito de calcio (es decir una mezcla de líquidos de lavado y sustancias solubles de sulfito) con un contenido de 18 gramos/litro de sustancias reductoras, se añadieron 136 mililitros de etanol crudo sintético (al 90% en peso), con lo que el contenido de todas las sustancias asimilables en la materia prima de sulfito se ajustó a 28 gramos/litro. A la materia prima enriquecida de este modo se añadieron 46 gramos de

cloruro de amonio, 7 gramos de cloruro de potasio, 4 gramos de cloruro de magnesio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), 5 mililitros de ácido ortofosfórico al 85%, y una sustancia de inoculación obtenida cultivando una mezcla de cultivo de CANDIDA UTILIS var. ARBOREA y CRYPTOCOCCUS DIFLUENS sobre líquidos agotados de sulfito, en una cantidad, correspondiente a la concentración inicial de los sólidos secos de fermentación, de 2 gramos/litro. El cultivo se efectuó en un fermentador de vidrio de laboratorio agitado mecánicamente, que tenía una capacidad total de 30 litros y una capacidad de alimentación durante el trabajo de 10 litros, en el que se alcanzó una velocidad de disolución de oxígeno de 200 milimoles de  $O_2$ /litro/hora. La temperatura de cultivo se mantuvo en 30°C y el valor de pH en 4,5 por medio de la adición de agua amoniacal (25% de  $NH_3$ ). El período de cultivo duró 15 horas. El medio maduro contenía 3 gramos/litro de residuo de sustancias reductoras y 16 gramos/litro de sólidos secos de fermentación. El contenido de etanol era nulo. El incremento obtenido de 140 gramos de sólidos secos de fermentación correspondía a un rendimiento de 50 por ciento de las sustancias reductoras consumidas y de 65 por ciento del etanol absoluto añadido.

25

## EJEMPLO II

A 10 litros de líquido agotado de sulfito, en el que el contenido de sustancias reductoras se redujo a  
5 4 gramos/litro cultivando una mezcla de cultivo de CANDIDA  
UTILLIS var. ARBOREA y CRYPTOCOCCUS DIFFLUENS, se añadie-  
ron 136 mililitros de etanol crudo sintético (al 90% en  
peso), que correspondía a 10 g. de etanol absoluto en un  
litro de la materia prima de sulfito, y además 46 gramos  
10 de cloruro de amonio, 7 gramos de cloruro de potasio, 4  
gramos de cloruro de magnesio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) y 5 mililitros  
de ácido ortofosfórico al 85%. Al medio nutricio acabado,  
en el fermentador citado en el EJEMPLO I, se añadió una  
sustancia de inoculación obtenida cultivando la mezcla de  
15 cultivo de levadura de CANDIDA UTILLIS var. ARBOREA y  
CRYPTOCOCCUS DIFFLUENS sobre líquido residual de sulfito,  
en una cantidad correspondiente a la concentración inicial  
de sólidos secos de fermentación, de 2 gramos/litro. Du-  
rante el cultivo, efectuado a 30°C, el valor del pH se man-  
20 tuvo en 4,5 por adición de agua amoniacal (25% de  $NH_3$ ). Al  
cabo de 3 horas de período de cultivo, durante el cual el  
contenido de etanol en el medio descendió a 2 gramos/litro,  
se añadieron otros 136 miligramos de etanol crudo sintéti-  
co. El cultivo se terminó al cabo de 8 horas, durante las  
25 cuales el contenido de etanol descendió a menos de 0,5 gra

mos/litro. El medio maduro contenía 15 gramos de sólidos secos de fermentación por litro. El incremento obtenido de 124 gramos de sólidos secos de fermentación correspondía al rendimiento de 62 por ciento del etanol absoluto añadi-  
 5 do. La biomasa lavada a fondo contenía en el sólido seco 8,5% de cenizas y 51% de la sustancia nitrogenada total, que tenía un 87,5 por ciento de coeficiente de digestibilidad. El contenido de aminoácidos en 100 gramos de la proteína cruda era el siguiente:

10

alanina	6,0	lisina	7,9
arginina	4,1	metionina	1,6
ácido aspártico	9,2	fenilalanina	4,1
cisteína	1,1	prolina	3,1
15 ácido glutámico	15,2	serina	4,7
glicina	4,8	treonina	4,3
histidina	2,4	triptófano	1,5
isoleucina	4,3	tirosina	3,2
leucina	8,1	valina	5,7

20

### EJEMPLO III

Se repitió el cultivo descrito en el Ejemplo II en el mismo fermentador, y usando la misma materia prima,  
 25 excepto en que se usó como sustancia de inoculación la es-

5           pecie CANDIDA UILLIS cultivada sobre un medio sintético con contenido de etanol. El período de cultivo tuvo una duración de 450 minutos, y el incremento obtenido del sólido seco de fermentación correspondía al rendimiento de 64 por ciento del etanol absoluto añadido.

10

#### REIVINDICACIONES

15           Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20           1ª.- Un método de producir proteínas de fermentación a partir de líquidos residuales de sulfito y productos solubles de recuperación de desperdicios de la fabricación de alcohol, que comprende las operaciones de aumentar la proporción de sustancias carbonosas asimilables en la materia prima de sulfito, por medio de una adición de etanol, hasta en un 10 por ciento en peso, y fermentar dicho

25

material, preferiblemente usando una sustancia de inoculación previamente cultivada sobre la materia prima de sulfito o sobre medios sintéticos con un contenido de etanol.

5                    2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que, antes de añadir etanol a la materia prima de sulfito, la proporción original de sustancias reductoras contenidas en la misma, por ejemplo, particularmente, sacáridos, se disminuye por procedimientos microbiológicos hasta 0,1 por ciento en peso.

10                    3ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª y 2ª, en el que el cultivo se efectúa usando una levadura que consume etanol, tal como, preferiblemente, una especie esporógena, tal como, por ejemplo, CANDIDA UTILLIS, CANDIDA UTILLIS var. ARBOREA, TORULOPSIS CANDIDA, CRYPTOCOCCUS  
15 ALBIDUS var. DIFFLUENS, o mezclas de las mismas.

4ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª, 2ª y 3ª, en el que el cultivo se efectúa continuamente en dos o más etapas, preferiblemente usando una separación intermedia.

20                    5ª.- Un método de producir proteínas de fermentación.

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

25

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

Madrid,

P.A.

**24 MAR. 1975**

5

**Alberto de Eizaburu**  
Por Poder.



- 14 -

17.3.75

MTP/.