

M/1

442784

MEMORIA DESCRIPTIVA

— PATENTE DE INVENCION.

DURACION: VEINTE AÑOS.

OBJETO: "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE PROTEINA UNICELULAR MEDIANTE FERMENTACIÓN MICROBIANA DE UN ALCOHOL".

— PRIORIDAD : Pais de Origen : Estados Unidos de Nortcamerica.

Serial número : 530.422.

Fecha depósito : 6 de Diciembre de 1.974.

Solicitante: PHILLIPS PETROLEUM COMPANY.

Residencia: BARTLESVILLE, Oklahoma, U.S.A.

Nacionalidad: norteamericana.

La invención se refiere a un procedimiento para la reproducción de células microbianas y, en uno de sus aspectos, está relacionado con un procedimiento de reproducción de células microbianas susceptibles de asimilar alcohol, mediante cultivo aerobio de un microorganismo adecuado que puede asimilar alcohol como fuente principal de carbono.

La actual escasez mundial de alimentos ha favorecido la investigación y el desarrollo de métodos para producir proteína microbiana de alta calidad y de precio reducido, es decir proteína unicelular, con el objeto de aliviar la escasez de alimentos. Se han realizado trabajos de desarrollo considerable de dichos procedimientos de fermentación con el objeto de utilizar hidrocarburos y otras materias derivadas del carbono procedentes del refinado del petróleo, que normalmente hasta ahora se quemaban o se desechaban. La utilización de metanol como fuente de carbono principal es particularmente interesante en razón de las ventajas que ofrece. Estas ventajas incluyen las siguientes : el metanol puede mezclarse con agua; puede fabricarse fácilmente y de manera económica a partir de una amplia gama de materiales hidrocarbonados; puede fabricarse fácilmente virtualmente en cualquier zona del mundo que disponga de alguna forma de combustible fósil; está caracterizado por la ausencia de hidrocarburos policíclicos cancerígenos, etc.

La presente invención puede ser considerada como un procedimiento de fermentación aerobia de una fuente de carbono asimilable por un microorganismo en fermentadores que funcionan estando esencialmente llenos de espuma. En un aspecto, la fuente de carbono es un alcohol que es asimilado por un microorganismo adecuado para producir células microbianas que pueden

ser empleadas como alimento (proteína unicelular). Se ha descubierto que la fermentación efectuada en un fermentador lleno de espuma, en ciertos procesos de fermentación, presenta un alto rendimiento cuando se efectúa en una operación continua. El contenido espumoso del fermentador puede ser definido como una dispersión de la fase gaseosa en la fase líquida o como una fase gaseosa emulsionada o simplemente como una emulsión de las fases gaseosas y líquida en la cual se produce una superficie de contacto más importante entre las fases gaseosas y líquida para mejorar la operación de fermentación. Mas particularmente, se ha comprobado que la productividad de la fermentación (en gramos de células por litro de mezcla y por hora) es notablemente superior cuando se emplea el fermentador de espuma, con relación a la productividad conseguida con un fermentador del tipo de depósito convencional provisto de paletas de agitación.

Los recipientes de fermentación adecuados para la formación y para la conservación del contenido en estado espumoso son bien conocidos en la técnica de fermentación. De manera general, estos recipientes son aquellos que efectúan una agitación vigorosa del contenido con la introducción simultánea de alguna sustancia conteniendo oxígeno, por ejemplo aire, en la mezcla. Durante la realización de la operación, pueden también utilizarse pequeñas cantidades de agentes activos superficialmente para facilitar la formación y la conservación de la espuma. Sin embargo, esto no es necesario generalmente porque es conocido que numerosos procesos de crecimiento microbiano incluyen la formación de materiales (celulares o extracelulares) que tienen las propiedades de agentes activos superficialmente y, por tanto, facilitan la formación de la espuma. De hecho,

en ciertos procesos de fermentación es a menudo necesario utilizar agentes antiespumantes para controlar el grado de formación de espuma durante la operación de fermentación.

65 Por consiguiente los objetivos principales de la invención son los siguientes: proporcionar un procedimiento de fermentación de una sustancia carbonácea a fin de producir el crecimiento de las células microbianas para obtener un producto alimenticio comestible, por ejemplo una proteína unicelular; proporcionar un procedimiento de este tipo que implica la utilización de un fermentador lleno de espuma utilizando metanol
70 como fuente de carbono asimilable; proporcionar un procedimiento de este tipo que puede ser utilizado con numerosos tipos de microorganismos, incluyendo los que están contenidos en las clases de bacterias, hongos, y levaduras, para la producción de una proteína unicelular; y proporcionar un procedimiento de este tipo eficaz y bien adaptado para la utilización prevista.
75

Sólamente a título de ejemplo demostrativo de la realización de las fases del procedimiento, se acompaña una hoja de dibujos, en cuya figura única se representa un reactor de fermentación típico, bien conocido en la técnica, que está
80 constituido por un recinto (1) con interior hueco. Un tubo de aspiración (2) está dispuesto en el interior del recinto (1) y proporciona un circuito de circulación para el medio contenido en el recinto (1), con el objeto de facilitar la formación de la circulación. En la extremidad inferior del tubo de aspiración (2) se halla una bomba, por ejemplo una bomba de turbina (3), que produce una circulación hacia abajo a través del tubo de aspiración (2) y a través de unos tamices de emulsio-
85 nado (4), hacia el exterior del tubo de aspiración (2) y hacia arriba a partir del mismo. Dispuestos en una zona adyacente a
90

la parte superior del recinto (1), se halla un divisor de espuma (5) que puede ser accionado para dividir la espuma que se acumula en la porción superior del recinto (1). Un orificio de salida (7) está dispuesto en una posición adyacente a la porción inferior del recinto (1) para extraer una parte del contenido con el objeto de someter este a un tratamiento ulterior. El orificio de salida (7) está constituido preferentemente por un tubo que une la porción inferior del recinto (1) con un equipo de tratamiento auxiliar (no representado). Un orificio de entrada (8) está dispuesto en una zona adyacente a la porción superior del recinto (1) y está adaptado para suministrar ciertas partes del medio utilizado en el proceso de fermentación. Unos medios de accionamiento, tales como unos motores (9 y 10), están conectados activamente con la turbina (4) y con el divisor de espuma (5), respectivamente. Un tubo (11) comunica con el interior del recinto (1) y está adaptado para introducir una fuente de oxígeno, por ejemplo aire, en el medio.

En una forma preferente de realización de la invención, la fermentación se efectúa con un alcohol de cadena recta que incluye de 1 a 16 átomos de carbono por molécula, el cual suministra el carbón y la energía para el crecimiento microbiano. Preferentemente, el alcohol incluye de 1 a 6 átomos de carbono por molécula, y más preferentemente, el alcohol será etanol o metanol, y, de manera todavía más preferida, metanol. Unos ejemplos de alcoholes adecuados incluyen el metanol, el etanol, el 1-propanol, el 1-butanol, el 1-octanol, el 1-dodecanol, el 1-hexadecanol, el 2-propanol, el 2-butanol, y el 2-hexanol. También pueden utilizarse mezclas de alcoholes si se desea así.

El microorganismo utilizado en la operación de fermentación es capaz de asimilar unos o varios de los alcoholes mencionados más arriba, como fuente de carbono y de energía en el crecimiento o en la reproducción del microorganismo. Los microorganismos adecuados pueden ser elegidos entre bacterias, levaduras y hongos.

Las levaduras adecuadas incluyen las especies procedentes de los géneros *Cándida*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Lypomices*, *Cryptococcus*, *Nematospora* y *Brettanomyces*. Los géneros preferidos incluyen *Cándida*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Pichia* y *Saccharomyces*. Unos ejemplos de especies adecuadas incluyen :

- Candida boidinii*.
- Candida mycoderma*.
- 135 *Candida utilis*.
- Candida stellatoidea*.
- Candida robusta*.
- Candida claussenii*.
- Candida rugosa*.
- 140 *Brettanomyces petrophilium*
- Hansenula minuta*.
- Hansenula saturnus*.
- Hansenula californica*.
- Hansenula mrakii*.
- 145 *Hansenula silvicola*.
- Hansenula polymorpha*.
- Hansenula wickerhamii*.
- Hansenula capsulata*.
- Hansenula glucozyma*.
- 150 *Hansenula henricii*.

- Hansenula nonfermentans.
Hansenula philodendra.
- Torulopsis candida.
Torulopsis bolmi.
155 Torulopsis versatilis.
Torulopsis glabrata.
Torulopsis molishiana.
Torulopsis nemodendra.
Torulopsis nitratophila.
160 Torulopsis pinus.
- Pichia farinosa.
Pichia polymorpha.
Pichia membranaefaciens.
Pichia pinus.
165 Pichia pastoris.
Pichia trehalophila.
- Saccharomyces cerevisiae.
Saccharomyces fragilis.
Saccharomyces rosei.
170 Saccharomyces acidifaciens.
Saccharomyces elegans.
Saccharomyces rouxii.
Saccharomyces lactis.
Saccharomyces fractum.
- 175 Las bacterias adecuadas incluyen las especies de los géneros Bacillus, Mycobacterium, Actinomyces, Nocardia, Pseudomonas, Methanomonas, Protaminobacter, Methylococcus, Arthrobacter, Methylomonas, Brevibacterium, Acetobacter, Micrococcus,

180 Rhodopseudomonas, Corynebacterium, Rhodopseudomonas, Microbac-
terium, Achromobacter, Methylobacter, Methylosinus y Methylo-
cystis. Los géneros preferidos incluyen Bacillus, Pseudomonas,
Protaminobacter, Micrococcus, Arthrobacter y Corynebacterium.

Unos ejemplos de especies adecuadas incluyen :

185 Bacillus subtilus.
Bacillus cereus.
Bacillus aureus.
Bacillus acidi.
Bacillus urici.
Bacillus coagulans.
190 Bacillus mycoides.
Bacillus circulans.
Bacillus megaterium.
Bacillus licheniformis.
Pseudomonas methanolica.
195 Pseudomonas ligustri.
Pseudomonas orvilla.
Pseudomonas methanica.
Pseudomonas fluorescens.
Pseudomonas aeruginosa.
200 Pseudomonas oleovorans.
Pseudomonas putida.
Pseudomonas boreopolis.
Pseudomonas pyocyanea.
Pseudomonas methylphilus.
205 Pseudomonas brevis.
Pseudomonas acidovorans.
Pseudomonas methanoxidans.
Pseudomonas aerogenes.

- Protaminobacter ruber.
- 210 Corynebacterium simples.
Corynebacterium hydrocarbooxydans.
Corynebacterium alkanum.
Corynebacterium oleophilus.
Corynebacterium hydrocarboclastus.
- 215 Corynebacterium glutamicum.
Corynebacterium viscosus.
Corynebacterium dioxydans.
Corynebacterium alkanum.
- Micrococcus cerificans.
- 220 Micrococcus rhodius.
- Arthrobacter rufescens.
Arthrobacter parafficum.
Arthrobacter simplex.
Arthrobacter citreus.
- 225 Methanomonas methanica.
Methanomonas methanooxydans.
- Methylomonas agile.
Methylomonas albus.
Methylomonas rubrum.
- 230 Methylomonas methanolica.
- Mycobacterium rhodochrous.
Mycobacterium phlei.
Mycobacterium brevicale.

- 235 Nocardia salmonicolor.
Nocardia minimus.
Nocardia corallina.
Nocardia butanica.

Rhodopseudomonas capsulatus.

Microbacterium ammoniaphilum.
- 240 Archromobacter coagulans.

Brevibacterium butanicum.
Brevibacterium roseum.
Brevibacterium flavum.
Brevibacterium lactofermentum.
- 245 Brevibacterium paraffinolyticum.
Brevibacterium ketoglutamicum.
Brevibacterium insectiphilium.

Las especies de hongos adecuadas incluyen las de los géneros Aspergillus, Monilia, Rhizopus, Penicillium,
250 Mucor, Alternaria y Helminthosporium.

Unos ejemplos de especies de hongos adecuadas incluyen :

- 255 Aspergillus niger.
Aspergillus glaucus.
Aspergillus flavus.
Aspergillus terreus.
Aspergillus itconicus.

Penicillium notatum.
Penicillium chrysogenum.
- 260 Penicillium glaucum.

Penicillium griseofulvum.

Penicillium expansum.

Penicillium digitatum.

Penicillium italicum.

265

Rhizopus nigricans.

Rhizopus oryzae.

Rhizopus delemar.

Rhizopus arrhizus.

Rhizopus stolonifer.

270

Mucor mucedo.

Mucor genevensis.

275

280

El crecimiento de los microorganismos es sensible a la temperatura de funcionamiento del fermentador, y cada microorganismo particular tiene una temperatura de crecimiento óptima. La amplia gama de temperatura utilizada para la operación de fermentación según la invención está incluida entre 30° C. y 65° C. aproximadamente, y preferentemente entre 35° C. y 60° C. La temperatura elegida dependerá generalmente del microorganismo utilizado en el procedimiento ya que este microorganismo tendrá una relación temperatura/velocidad de crecimiento algo diferente.

285

290

En la práctica del invento, se suministra un medio nutritivo adecuado al fermentador para proporcionar elementos nutritivos tales como una fuente asimilable de nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio, potasio, azufre y sodio, así como indicios de cobre, manganeso, molibdeno, zinc, hierro, boro, yodo y selenio. Como es bien conocido en la técnica de la fermentación, las cantidades relativas de los elementos nutritivos mencionados mas arriba pueden variar de acuerdo con el microorganismo elegido para la operación. Además, el medio

nutritivo puede tambien contener vitaminas, según es bien conocido en esta técnica, cuando se sabe que su presencia es conveniente para la reproducción de ciertos microorganismos. Por ejemplo, numerosas levaduras parecen exigir la presencia de una o ambas de las vitaminas biotina y tiamina, para su reproducción adecuada. Un ejemplo típico de un medio nutritivo adecuado es el siguiente :

295

Un litro de solución acuosa

	<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
300	H ₃ PO ₄ (85%)	2,0 ml.
	KCl	1,0 g.
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g.
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2 g.
	NaCl	0,1 g.
305	Solución de indicios minerales	5,0 ml.

La solución de indicios minerales indicada más arriba tiene la siguiente fórmula :

310

Un litro de solución acuosa
(Solución de indicios minerales)

	<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,06 g
	KI	0,08 g
	FeCl ₃ .6H ₂ O	4,80 g
315	MnSO ₄ .H ₂ O	0,30 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,20 g
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,00 g
	H ₃ BO ₃	0,02 g

320 Cuando se utiliza el medio nutritivo descrito más arriba, se obtiene la fuente de nitrógeno asimilable añadiendo

separadamente amoniaco acuoso (NH_4OH) al recipiente de fermentación. La cantidad de NH_4OH que se añade dependerá del pH deseado para la mezcla de reacción. Si no se añade ninguna cantidad de NH_4OH , el pH del medio nutritivo será de 2 aproximadamente. Para la utilización de levaduras u hongos en la operación de fermentación, el pH está incluido preferentemente en la gama de 3-5 aproximadamente, y para la utilización de bacterias el pH estará incluido preferentemente en la gama de 6-7,5 aproximadamente.

330 La reacción de fermentación es una operación aerobia en la cual el oxígeno necesario para la operación puede ser suministrado a partir de una fuente que contiene oxígeno libre tal como el aire, que se suministra adecuadamente al recipiente de fermentación, bajo una presión de aproximadamente 1 a 100 atmósferas, y, preferentemente, de 1 a 10 atmósferas. Una buena fuente de oxígeno es aire enriquecido con oxígeno. A menudo la reacción de fermentación es favorecida por la utilización de una presión incluida en la ancha gama descrita más arriba y en la gama preferida.

340 Preferentemente, la operación de fermentación según la invención es del tipo continuo, pero puede llevarse a cabo bajo la forma de una operación intermitente. En la operación continua o en la operación intermitente, el reactor de fermentación se esteriliza en primer lugar y a continuación se inocula con un cultivo del microorganismo deseado en presencia de todos los elementos nutritivos necesarios, que incluyen oxígeno y la fuente de carbono. En el método de funcionamiento continuo se introduce continuamente la fuente de oxígeno o el aire conjuntamente con la introducción continua del medio nutritivo, de la fuente de nitrógeno (si se añade por separado) y de alcohol

con un caudal, bien predeterminado, o bien de acuerdo con las necesidades, que pueden ser determinadas, mediante la supervisión de factores tales como la concentración de alcohol, el oxígeno disuelto, y el oxígeno o el dióxido de carbono en el efluente gaseoso procedente del fermentador. El caudal de alimentación de los varios materiales puede ser cambiado para obtener el crecimiento celular lo más rápido posible compatible con una utilización eficaz del alimento alcohólico, es decir, para obtener un elevado rendimiento de peso de células por cada unidad de peso de alimento alcohólico introducido.

Como es bien conocido en esta técnica, el caudal de alimentación con alcohol constituye una variable de control importante ya que con una elevada concentración este material puede inhibir el crecimiento de las células e incluso matar los microorganismos. Por tanto, el caudal de alimentación del alcohol se ajusta de tal manera que el alcohol sea consumido por los microorganismos, esencialmente a la misma velocidad que se introduce en el fermentador. Cuando se obtiene esta condición, se obtendrá naturalmente una cantidad pequeña o nula de alcohol en el efluente que sale continuamente del fermentador en una operación de tipo continuo. Sin embargo, puede obtenerse un funcionamiento satisfactorio con una concentración volumétrica de alcohol de hasta 0,5% en el efluente. Para obtener una elevada productividad de células o un elevado ritmo de crecimiento, la concentración del alcohol en los productos de alimentación del fermentador debe estar incluida entre 7 y 30% del volumen aproximadamente.

Para la realización intermitente o continua del procedimiento según la invención, la concentración de la materia prima de alimentación, por ejemplo el metanol, en el fermenta-

dor, debe estar incluida entre 0,001 y 5% (v/v) y preferente-
mente entre 0,005 y 0,5% (v/v). Naturalmente, es posible, y
en algunos casos es aconsejable, añadir la materia prima de
alimentación progresivamente, a un proceso de fermentación
385 intermitente por lo demás típico.

Es bien conocido en esta técnica que se dispone de
instrumentos adecuados para medir la densidad de la células,
el pH, el oxígeno disuelto y la concentración de alcohol en
el fermentador, así como las corrientes de alimentación y de
390 salida con el objeto del proporcionar una supervisión bastante
completa de la operación de fermentación, estando la instru-
mentación adaptada para controlar los caudales de entrada con
el fin de obtener un funcionamiento óptimo del proceso. Los
materiales introducidos en el fermentador se someten preferen-
395 temente a esterilización, como se suele hacer normalmente en
estas técnicas, para impedir la contaminación de la mezcla de
fermentación deseada por cualquier microorganismo vivo inde-
seable.

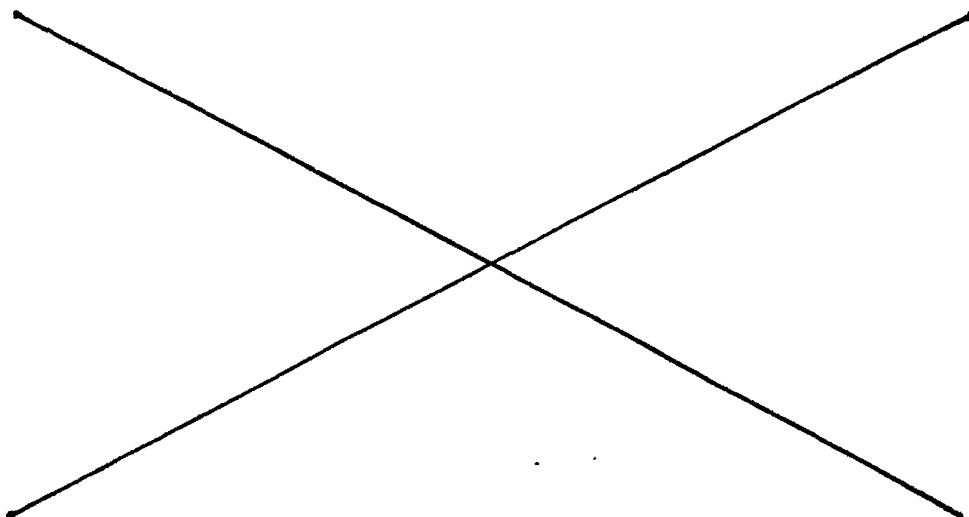
El efluente que sale del recipiente de fermentación
400 se trata adecuadamente para separar de él las células micro-
bianas que contienen la proteína unicelular. El método de tra-
tamiento usual es bien conocido por los peritos en la materia
y consiste en emplear calor y/o agentes reactivos químicos,
por ejemplo ácidos, para matar las células microbianas y fa-
405 cilitar su separación de la fase acuosa mediante coagulación
o floculación de las células. Después de este tratamiento se
centrifuga la mezcla para eliminar la mayoría de la fase lí-
quida y, a continuación, las células separadas se secan toda-
vía más por ejemplo con secadores de tambor o secadores de
410 pulverización. Si se utilizan levaduras como cultivo, la se-

cuencia de operaciones que antecede puede ser modificada, centrifugando en primer lugar el efluente para separar las células que, a continuación se matan mediante calor, antes o durante la fase de secado ulterior. Después de su separación y secado, las células que contienen una elevada cantidad de proteína, están dispuestas o disponibles para ser empleadas como fuente de alimentos por los animales y/o los humanos.

La proteína unicelular producida por el procedimiento descrito anteriormente tiene una utilidad particularmente importante en el mundo actual. Como se ha puesto de evidencia de manera creciente en los últimos años, el suministro de proteína abundante y económica disponible para el consumo humano o animal, bajo la forma de harina de pescado o harina de soja, está sometido a una fuerte demanda por parte de la población mundial que no deja de aumentar y en razón de la reciente reducción en la producción de ciertos tipos de proteínas tales como por ejemplo la harina de pescado basada en la pesca del boquerón. La producción de proteína unicelular (SCP) constituye un medio de aliviar esta situación, proporcionando una fuente de proteína adecuada para ser incluida en la alimentación de aves, porcinos y otros ganados, los cuales suministran directa o indirectamente la proteína destinada al consumo humano. Las células microbianas producidas de acuerdo con el procedimiento antes descrito constituyen adecuadas fuentes de proteína unicelular y por tanto pueden ser empleadas para la alimentación. Es sabido que la proteína producida por este procedimiento puede ser utilizada en otras aplicaciones tales como la preparación de composiciones adhesivas a base de proteína y parecidas.

E J E M P L O I

Se efectuaron tres operaciones de fermentación con metanol como carbono y fuente de energía en un fermentador funcionando lleno de espuma. Este fermentador era del tipo general antes descrito. Su volumen era de 1.500 l. aproximadamente. En cada tanda se mantuvo la temperatura a 32° C. y el pH en 6,6. En cada tanda no se detectó sustancialmente ninguna cantidad de metanol en el efluente del fermentador y la concentración de metanol en el producto de alimentación era de 10% del volumen. En estas tandas se utilizó como medio nutritivo el que se ha descrito mas arriba. El microorganismo empleado en cada una de estas tandas era una bacteria caracterizada como de la especie Pseudomonas y era el Pseudomonas metanica identificado por el número de depósito NRRL B3449. Los datos presentados en la tabla I que sigue, han sido tomados después de que cada tanda hubiese alcanzado esencialmente un estado de funcionamiento constante (aproximadamente después de 12 horas de funcionamiento continuo). Las tandas se realizaron a tres presiones diferentes según se indica en la tabla.



T A B L A I

		Tanda Núm.		
		1	2	3
465	Presión, atmósferas	1	1,97	2,6
	Carga del fermentador, kg.	830	810	750
	Caudal de aire, m ³ /hora	164	125(a)	68,5(b)
	O ₂ disuelto en el fermentador % (c)	48	55	15
	O ₂ cantidad en el aire de evacuación, % (d)	78	67	40
470	Caudal de alimentación del medio, l/h	145	235	270
	Caudal de alimentación (e) de NH ₄ OH, l/h	0,8	2,3	4
	Peso de células secas, g/l	22,7(f)	30,6(g)	24,6(f)
475	Velocidad de rotación del agitador del fermentador r.p.m.	1110	950	940
<u>Valores calculados</u>				
480	Velocidad de dilución, h ⁻¹	0,175	0,29	0,36
	Tiempo de permanencia, h.	5,7	3,44	2,8
	Velocidad de aireación, V/V/minuto	3,3	2,5	1,5
	O ₂ consumido, kg/kg de células	3,6	2,3	3,3
	Rendimiento de células, kgCH ₃ OH(h)/kg de células	3,48	2,58	3,21
	Proteína cruda, % (i)	75	75	75
	Productividad, gramos de células/l/h.	4,0	8,9	8,8
485	(a) con una presión de entrada de 2 atmósferas.			
	(b) Con una presión de entrada de 2,75 atmósferas.			
	(c) Basándose en un contenido de O ₂ disuelto sin que ninguna célula esté presente.			
490	(d) Basándose en un contenido normal de O ₂ en el aire.			
	(e) Valores aproximados del consumo de NH ₄ OH (25% del peso de NH ₃)			
	(f) Células aisladas por filtración de una muestra a través de un filtro Millipore.			
	(g) Células aisladas mediante centrifugación de una muestra de 10 cm ³ , lavado de las células, recentrifugación, secado y pesado de las células.			
495	(h) Basándose en el metanol consumido.			
	(i) Contenido de nitrógeno de las células obtenido por análisis de Kjeldahl, X 6.25.			

Los resultados de estas tandas demuestran los excelentes resultados de productividad de la operación de fermentación

500

tación continua, utilizando un fermentador esencialmente lleno de espuma con una capacidad de transferencia de oxígeno de aproximadamente 1.000 milimol de O₂ por litro y por hora de mezcla líquida de reacción de fermentación.

505

E J E M P L O II

(Control)

Se efectuó una tanda de fermentación continua (4) utilizando el mismo cultivo de bacteria, el mismo medio nutritivo y la misma concentración de metanol que en las tandas del ejemplo I. La temperatura (40^o C) y el pH (6,3) eran también muy parecidos a los utilizados en las tandas del ejemplo I. Sin embargo, para esta tanda se utilizó un depósito convencional de grandes dimensiones, equipado con un solo agitador de paleta como recipiente de fermentación funcionando a la presión atmosférica. El volumen de la mezcla de fermentación era de 1.125 l. aproximadamente. No se detectó la presencia de metanol en el efluente del fermentador. En esta tanda se obtuvo un peso de células secas de 19,1 g/l. En lo que sigue se indican otros resultados calculados que corresponden a esta tabla.

515

515

520

	Velocidad de dilución, h ⁻¹	0,12
	Tiempo de permanencia, h.	8,3
	Rendimiento, kg de CH ₃ CH/kg de células	-4,0
525	Proteína cruda, %	75
	Productividad, g/l/h.	2,3

Los resultados de productividad de esta tanda son claramente inferiores a los de la tanda 1 del Ejemplo I, tanda comparable que utiliza un fermentador lleno de espuma.

530

E J E M P L O III

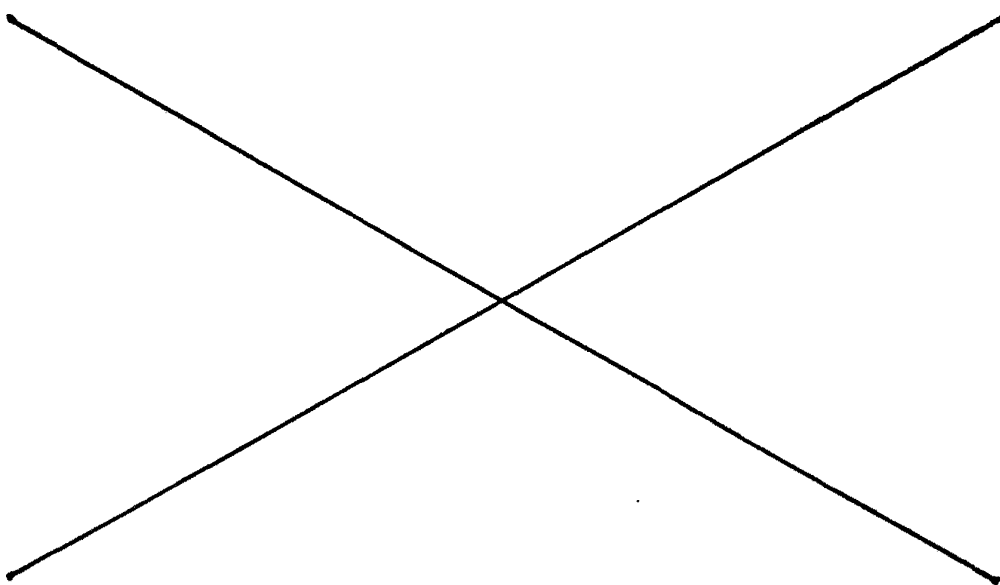
Se efectuaron otras dos tandas de fermentación de

535 metanol en operación continua, utilizando el fermentador lleno de espuma utilizado en el Ejemplo I, y empleando el mismo medio nutritivo que en el Ejemplo I, pero con un cultivo de levadura identificado por Hansenula polymorpha.

En estas tandas se utilizó una concentración de metanol de 10% del volumen en el producto de alimentación y no se detectó ninguna cantidad de metanol en el efluente del fermentador. Cada tanda se realizó a la presión atmosférica.

540 Durante la tanda 5 se descubrió que la mezcla de fermentación había sido contaminada con un hongo filamentososo. Se cree que esta contaminación no ha tenido ningún efecto notable sobre los datos de funcionamiento de esta tanda pero se esterilizó el sistema del reactor antes de la tanda 6 que se efectuó sin contaminación aparente.

Los datos de la tanda 5 y 6 se presentan en la tabla II que sigue. Los datos indicados se consideran como típicos de la fermentación continua del metanol en las condiciones ilustradas.



550

T A B L A II

		<u>Tanda N°</u>	
		<u>5</u>	<u>6</u>
	Carga del fermentador, kg.	800	725
	Temperatura, °C.	38	39
555	Caudal de aire, m ³ /h.	101	121
	O ₂ disuelto en el fermentador, % (a)	24	---(b)
	Nivel de O ₂ en el aire de salida, %	---(b)	84
	pH	3,5	3,6
	Caudal de alimentación del medio, l/h.	112	86
560	Caudal de alimentación (c) de NH ₄ OH(25%)l/h.	---(b)	1
	Peso de células secas, g/l.	26	24
	Velocidad de rotación del agitador del fermentador, r.p.m.	1000	980
<u>Valores calculados</u>			
565	Velocidad de dilución, h ⁻¹	0,14	0,12
	Tiempo de permanencia, h.	7,2	8,4
	Velocidad de aireación, V/V/min.	2,1	2,8
	O ₂ consumido, kg/kg de células	3	3,4
570	Rendimiento de células, kg de CH ₃ OH(d)/ /kg de células	3,04	3,29
	Proteína cruda, % (e)	54	54
	Productividad, g/l/h.	3,6	2,9
575	(a) Véase nota (c) tabla I.		
	(b) No determinado.		
	(c) Véase nota (e) tabla I.		
	(d) Véase nota (h) tabla I.		
	(e) Véase nota (i) tabla I.		

Estos resultados demuestran la utilización de una levadura para la fermentación continua del metanol en un fermentador lleno de espuma con el fin de obtener proteína unicelular.

Ya que la levadura tiene de manera inherente una velocidad de crecimiento inferior a la de las bacterias, la productividad ilustrada en la tabla II es inferior a la que ha sido obtenida utilizando bacterias.

585

442784



590 Todo aquello que sea accesorio en la realización del procedimiento descrito podrá ser objeto de modificaciones y las cuestiones de forma, dispositivos y máquinas utilizadas en la ejecución de la invención, deberán tomarse como de orden secundario, pudiéndose emplear aquellos que mejor convengan en tanto no alteren fundamentalmente las particularidades características.

595 La solicitante se reserva el derecho de obtención de los oportunos Certificados de Adición complementarios por las mejoras o perfeccionamientos que en lo sucesivo pudiera aconsejar la práctica.

N O T A :
=====

600 Descrita suficientemente la naturaleza y alcance de la presente invención, así como la forma en que la misma puede ser llevada a la práctica, se reivindican a título privativo las siguientes particularidades características sobre las cuales ha de recaer la concesión del privilegio de PATENTE DE INVENCION que se solicita.

605 1). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, mas especialmente un alcohol alifático de cadena recta que contiene de 1 á 16 átomos de carbono por molécula en virtud de la acción de un microorganismo capaz de asimilar dicho alcohol como
610 fuente principal de carbono, estando dicho procedimiento caracterizado porque la zona de fermentación se mantenga sustancialmente llena de espuma.

615 2). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según la reivindicación 1), caracterizado porque el alcohol contiene de

1 á 6 átomos de carbono por molécula.

3). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según la reivindicación 2), caracterizado porque el alcohol es metanol.

620

4). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque el microorganismo es una bacteria, una levadura o un hongo.

625

5). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según la reivindicación 4), caracterizado porque el microorganismo es Pseudomonas methanica.

630

6). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según la reivindicación 4), caracterizado porque el microorganismo es Hansenula polymorpha.

635

7). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según una cualquiera de las reivindicaciones 3) á 6), caracterizado porque la concentración de metanol en la mezcla de reacción está incluida en la gama de 0.001 á 5 volúmenes por ciento.

640

8). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, caracterizado en que la fermentación se efectúa a presión superior a la presión atmosférica.

645

9). Procedimiento de obtención de proteína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol, según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, caracterizado



porque la zona de fermentación se mantiene a una temperatura incluida en la gama de 30 á 65º C.

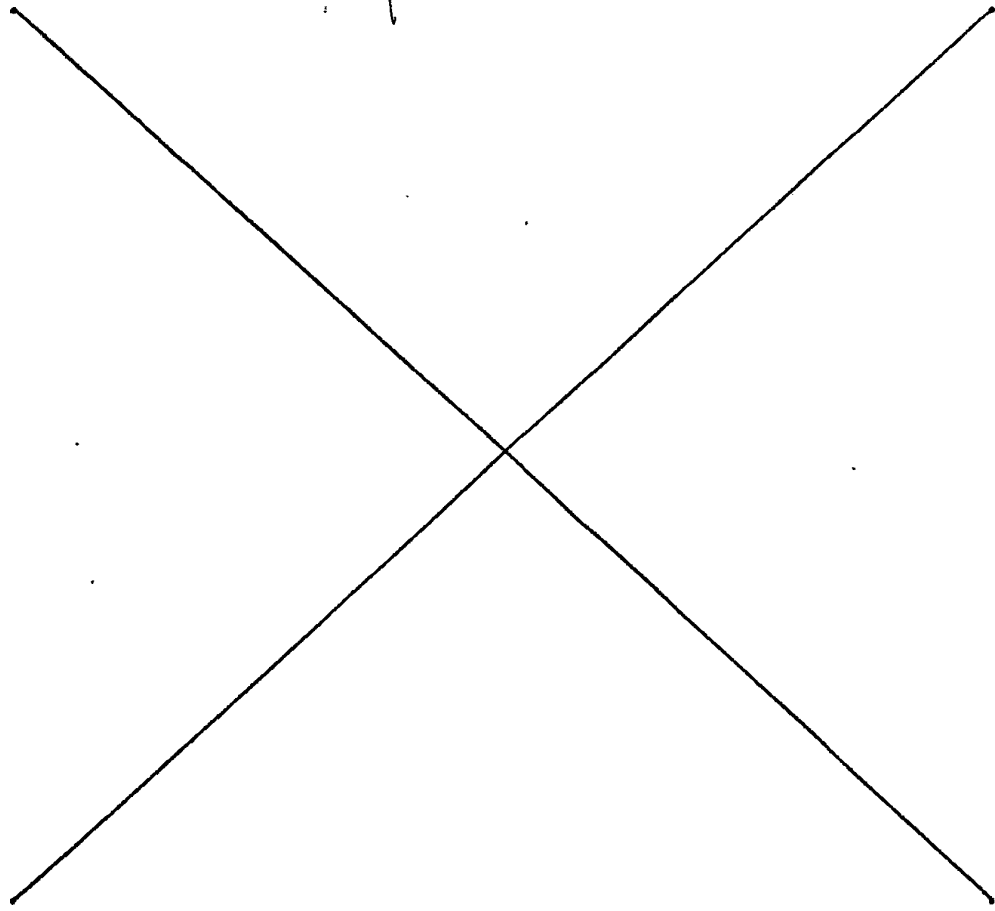
10). "PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR MEDIANTE FERMENTACIÓN MICROBIANA DE UN ALCOHOL".

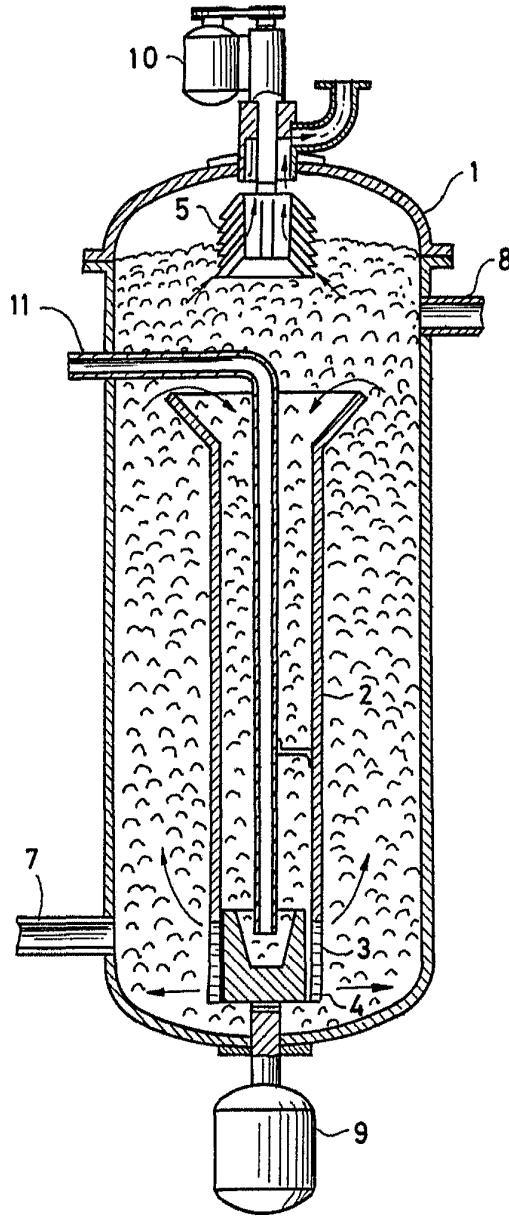
Todo según queda expuesto en la presente Memoria, que consta de veinticuatro hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara, y una hoja de dibujo que con la misma se acompaña.

MADRID, 19 de Noviembre de 1.975.

P. A.

Modesto P. A.
F. F.





Madrid 19 NOV. 1975

ESCALA VARIABLE

[Handwritten signature]
F. F. I.