



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	451936		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			29 SEPTIEMBRE 1976		

PATENTE DE INVENCION

Δ1 451.936 771101 C12D 13/06

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	618.191		30 Septiembre 1.975		EE.UU de Norteamerica.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12D		

64	TITULO DE LA INVENCION
	" UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCCION DE MATERIA PROTEICO UNICELULAR "

71	SOLICITANTE (S)
	PHILLIPS PETROLEUM COMPANY.

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	BARTLESVILLE, Oklahoma, U.S.A.

72	INVENTOR (ES)
	Donald Oliver Hitzman.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	MODESTO POLO SANZ, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de proteína de una sola célula.

Entre los esfuerzos para aliviar la escasez mundial de proteínas se encuentran diversos procesos de biosíntesis donde se obtienen proteínas de una sola célula denominado a lo largo de la memoria como (SCP) producidas biológicamente mediante el crecimiento de diversos microorganismos sobre una variedad de substratos conteniendo carbono. Las fuentes de carbono y energía utilizadas como substratos deben ser extensamente asequibles, relativamente baratas, uniformes y seguras en el sentido de que no deben dejar residuos perjudiciales en el producto proteico finalmente obtenido por conversión microbiana. Los hidrocarburos del petróleo se han empleado como fuente de carbono y energía pero se han enfrentado con dificultades prácticas por su falta de solubilidad en agua, por su elevado consumo de oxígeno para favorecer la conversión microbiana y, según se alega, por las trazas de agentes potencialmente carcinógenos procedentes de los materiales de alimentación de petróleo que entran o se adhieren en el producto proteico.

otros procedimientos se han centrado en el uso de derivados de hidrocarburos oxigenados como materiales de alimentación, debido a su solubilidad en agua y por ello a su facilidad de manipulación, ya que los procesos de conversión microbiana se realizan esencialmente en condiciones acuosas. Estos materiales de alimentación son fácilmente asequibles ya sea procedentes de fuentes de petróleo, fuentes de gas natural, procesado de diversos desperdicios/basuras y conversión de metano y similares, procedentes de la fermentación de diversos granos y similares, destilación des-

- [tructiva de la madera, etc. Estos hidrocarburos oxigenados,]
cualquiera que sea su origen, son materiales de alimentación
ampliamente asequibles y relativamente baratos para los pro-
cesos de fermentación. Otra ventaja es que estos materiales
5 de alimentación están parcialmente oxigenados de manera que
para el proceso de conversión-crecimiento microbiano se uti-
lizan unas cantidades de oxígeno moleculares considerablemen-
te reducidas.

Sin embargo, otro factor difícil y limitante en la
10 comercialización de los procesos de obtención de proteínas
de una sola célula ha sido la necesidad de funcionar a tem-
peraturas relativamente moderadas del orden de 20 á 50°C y
mejor no superiores a 35°. La conversión microbiana es una
reacción de oxidación altamente exotérmica produciéndose
15 grandes cantidades de calor, calor que debe ser eliminado
continua y constantemente porque si no se corre el riesgo de
sobrecalentar el sistema y matar los microorganismos o por
lo menos limitar gravemente el crecimiento a medida que
aumenta la temperatura y con ello obtener graves reducciones
20 de las eficiencias.

Muchos procedimientos se han concentrado en el
empleo de una u otra de las muchas levaduras existentes como
microorganismos. Se dispone de muchas levaduras y las célu-
las de la levadura generalmente son ligeramente mayores que
25 una célula bacteriana y algunas veces permiten una separa-
ción mas sencilla del proceso de fermentación.

Sin embargo, las bacterias presentan ventajas ya
que se obtienen mayores contenidos de proteína cruda de la
célula a partir de las bacterias en comparación con la pro-
30 ducción que se obtiene de las levaduras en general, ya que

- [estas últimas contienen mayores proporciones de material es-
structural no proteico en sus células. Las bacterias, habitual
mente presentan un contenido verdadero en proteína considerá-
blemente más alto, siendo con frecuencia de mayor valor nutri-
5 tivo en los importantes aminoácidos sulfurados y lisina.

El descubrimiento de bacterias con capacidad de rápido crecimiento y alta productividad a temperaturas del proceso de fermentación relativamente elevadas es evidentemente ventajoso. Una operación de crecimiento a alta tempe-
10 ratura significa menos calor que eliminar, menos aparatos refrigerantes implicados y finalmente cantidades relativamen- te menores de calor necesarias para los procesos de esterili- zación, coagulación y separación. El peligro de contaminación con otros microbios es tambien considerablemente reducido.
15 Se necesitan bacterias termofílicas o termotolerantes para la comercialización del proceso de obtención de proteína de una sola célula.

Se han descubierto dos especies termofílicas úni- cas de bacterias, división "Protophyta", clase "Schizomyce-
20 tes", orden "Eubacteriales", familia "Bacillaceae", género "Bacillus", con propiedades muy interesantes y útiles. Estas especies termofílicas únicas crecen mejor a temperaturas altas que a las temperaturas convencionales.

Estas dos especies únicas son termofílicas, se
25 desarrollan eficazmente con gran productividad en materiales de alimentación hidrocarbonados oxigenados, especialmente en alcoholes inferiores y todavía mejor en metanol o etanol, a temperaturas donde otras especies conocidas de "Bacillus" o son relativamente improductivas o simplemente no las pueden
30 tolerar o son improductivas e intolerantes con un material de

- [alimentación hidrocarbonado oxigenado. Estas especies únicas] son designadas como sigue:

	<u>Nombre del cultivo</u>	<u>Designación de la cepa</u>	<u>Designación depositada</u>
	Bacillus, sp.	47	NRRL B-8065
5	Bacillus, sp.	72	NRRL B-8066

Las denominaciones NRRL B-8066 y NRRL B-8065 reflejan el hecho de que se ha depositado la cepa de Bacillus sp. termofílico 72 y la cepa de Bacillus sp. 47 en la sede oficial, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Agricultural Research Service, Northern Region Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604, depositando allí 30 preparados liofilizados de cada uno de ellos y se ha recibido del depósito oficial las denominaciones de cepa NRRL individuales indicadas. Estos cultivos únicos han sido depositados de acuerdo con los procedimientos del Departamento de Agricultura de forma que la progenie de estas cepas sea asequible, durante el periodo en que esta solicitud de patente esté en tramitación, para una persona determinada por el Agente de Patentes de los Estados Unidos de acuerdo con las normas establecidas según Rules of Practice in Patent Cases y 35 U.S.C. 122. El depósito se ha realizado de acuerdo con la práctica de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de tal manera que todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de la progenie de las cepas únicas serán irrevocablemente levantadas al concederse la patente de las que estas importantes cepas constituyen el objeto, de manera que estas cepas sean asequibles para proporcionar muestras para su utilización de acuerdo con esta invención. Así, las muestras de cultivo de estos depósitos o de los mismos cultivos a partir de los que se han realizado los depósitos, proporcionan así

- [cepas derivadas de las especies termofílicas aquí descubier-
tas.

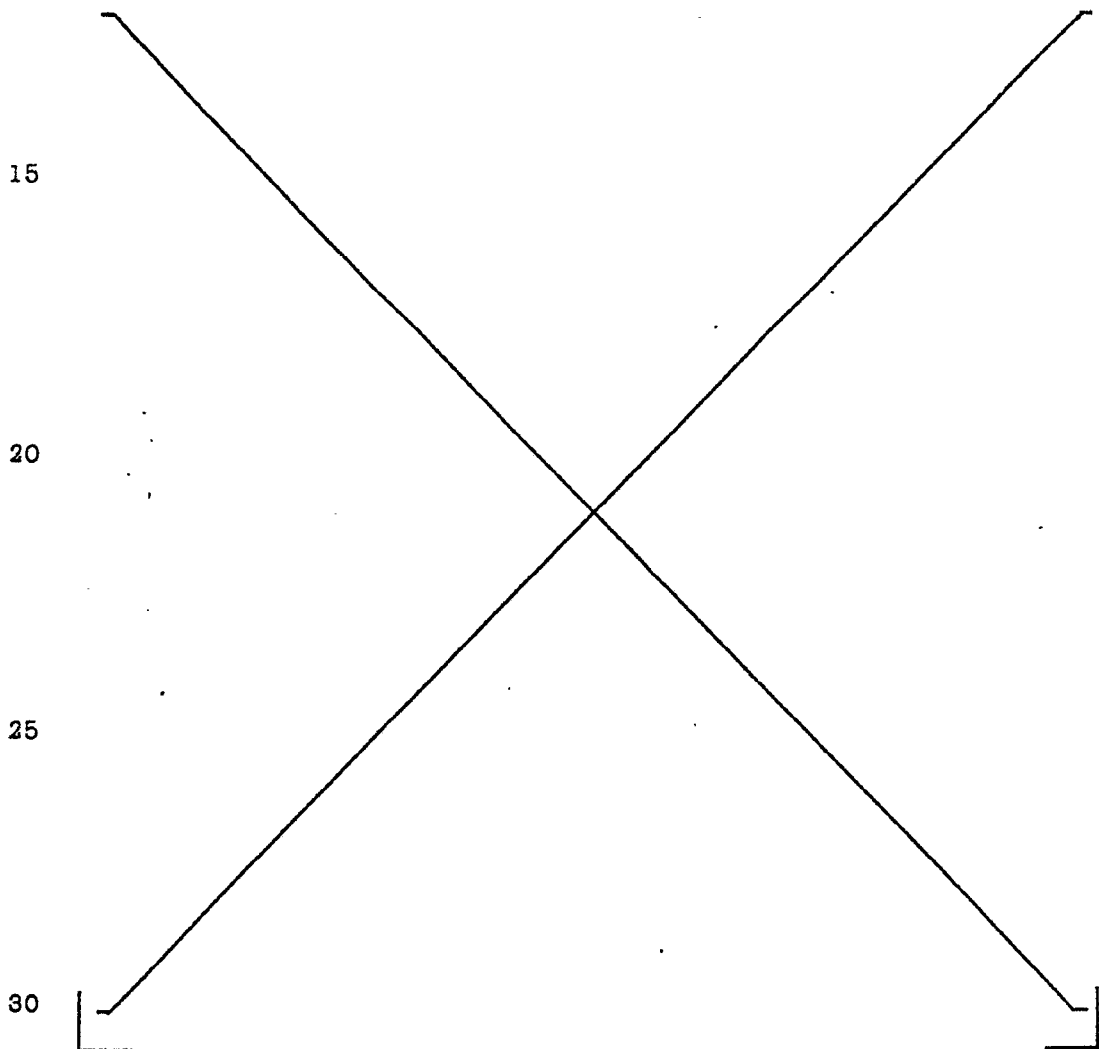
Se han descubierto dos cepas de bacterias termofílicas de eficacia peculiar y única de la especie "Bacillus" que se han denominado cepa 47 y que ha recibido la denominación de depósito NRRL B-8065 y cepa 72 que ha recibido la designación de depósito NRRL B-8066. Las cepas de "Bacillus" son altamente productivas a temperaturas de fermentación relativamente elevadas, produciendo productos proteicos de una sola célula interesantes y valiosos, con un alto contenido en proteína del tipo y balance de aminoácidos deseables. Estas únicas especies de "Bacillus" que prefieren las altas temperaturas significan una mayor velocidad de producción de proteínas de una sola célula, reducen los requisitos de refrigeración cuando se cultivan sobre un substrato de carbono y energía de un hidrocarburo oxigenado, preferiblemente un alcohol inferior y todavía mejor metanol o etanol y actualmente se prefiere el metanol o un substrato que contiene sustancialmente metanol. Además, se anticipa que estas nuevas especies de "Bacillus" que prefieren las temperaturas elevadas encontrarán especial aplicación en los medios de fermentación llenos de espuma.

El cultivo No. 72, NRRL B-8066, es un microbio formador de esporas, Gram-positivas, de la especie "Bacillus" de aspecto de varilla estrecha. No se han observado pigmentos coloreados en las células.

El cultivo No. 47, NRRL B-8065, es un microbio formador de esporas, Gram-positivas, de la especie "Bacillus" de aspecto de varilla gruesa. No se ha observado ningún pigmento coloreado en las células.

- [Esta invención, que proporciona el procedimiento
para el cultivo de células microbianas que asimilan hidrocar-
buros oxigenados pertenecientes a dos nuevas especies de mi-
croorganismos, se dirige al cultivo aerobio en un medio que
5 contiene hidrocarburos oxigenados como fuente de carbono y
energía, a temperaturas de fermentación relativamente eleva-
das, quedan lugar a una rápida propagación de las células.

Los microorganismos nuevos y únicos recién aisla-
dos pueden ser caracterizados por las propiedades indicadas
10 en la siguiente tabla, junto con las propiedades de varios
cultivos conocidos de "Bacillus":



Cultivos de Bacillus

Propiedad del cultivo o resultado del ensayo	Cultivo 47 MRL 3-8065	Cultivo 72 MRL 3-8066	<i>B. licheniformis</i> MRL 3-8067	<i>B. coagulans</i> MRL 3-8068	<i>B. subtilis</i> MRL 10774	<i>B. stearotheomorphilis</i> MRL 12987
Manchado Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Variable
Formación de esporas	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Aerobio	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tamaño aproximado, micras	0,5x1-2,5	0,6x1-5	0,6-0,8x1,5-2	0,6-2,5x1-5	0,7-0,8x2-3	0,6-1x2-5
Motilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Temperatura óptima °C.	55	55	32-45	32-45	28-40	30
Temp. máxima, °C.	60-65	60-65	50-56	55-60	50-55	50-55
Intervalo de pH	5-9	5-9	5,2-8,2	5-7	5-8,6	4,5-6,6
pH óptimo (medio IM2)	6,2-6,8	6,2-6,5	NG	NG	NG	NG
Factores de crecimiento	no requiere	no requiere	no requiere	tiamina, biotina, NG	no requiere	NG
Pigmentos en medio IM2 + 1,5% CH ₂ OH	castaño, soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos.	amarillo, soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos.	NG	NG	NG	NG
Aspecto de las células	de varillas a cadenas	de varillas a cadenas	varillas, sin cadenas	varillas, sin cadenas	varillas, sin cadenas	varillas, sin cadenas
Aspecto de la colonia sobre medio IM2 + 1,5% CH ₂ OH	Circular e levado, cas- taño pálido	circular el- vado, blan- quecino	NG	NG	NG	NG
Crecimiento a 55°C. sobre:	-	-	+	+	+	+
Caldo nutritivo	-	+	+	+	-	+
Caldo nutritivo + 1% CH ₂ OH	+	+	-	-	-	-
IM2 + 0,5% CH ₂ OH	+	+	-	-	-	-
IM2 + 1,5% CH ₂ OH	-	-	+	+	+	+
Glucosa	+	+	-	-	-	-
CH ₂ OH	+	+	-	-	-	-
CH ₂ CH ₂ OH	+	+	-	-	-	-
HO ₂ C	+	+	-	-	-	-
EM + 1,5% CH ₂ OH + 0,1% NaCl	+	+	-	-	-	-
EM + 5% CH ₂ OH	+	+	-	-	-	-
Recuento de placas + 1,5% CH ₂ OH	bordes exten- didos trans- lúcidos.	pequeñas am- polas trans- lúcidas	-	-	-	-

+ = evidencia visible de crecimiento, determinada por un aumento de la turbidez de la mezcla inicial.
 - = no hay crecimiento; no hay evidencia visible de crecimiento.
 + = se mantiene pero no hay evidencia visible de crecimiento adicional.
 NG = no crece en estos medios.

POOR QUALITY

Cultivos de Bacillus

<u>Propiedad del cultivo o resultado del ensayo</u>	<u>Cultivo 47 NRRL B-8065</u>	<u>Cultivo 72 NRRL B-8066</u>	<u>B.licheniformis NRRL B-100</u>	<u>B. SR</u>
Manchado Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Pos
Formación de esporas	Si	Si	Si	Si
Aerobio	Si	Si	Si	Si
Tamaño aproximado, micras	0,5x1-2,5	0,6x1-5	0.6-0.8x1.5-3	C.
Motilidad	Si	Si	Si	Si
Temperatura óptima °C.	55	55	32-45	33
Temp. máxima, °C.	60-65	60-65	50-56	55
Intervalo de pH	5-9	5-9	5.2-8.2	5-
pH óptimo (medio IM2)	6.2-6.8	6.2-6.5	NG	NG
Factores de crecimiento	no requiere	no requiere	no requiere	bi
Pigmentos en medio IM2 + 1.5% CH ₃ OH	castaño, soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos.	amarillo, soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos.	NG	NG
Aspecto de las células	de varillas a cadenas	varillas	varillas, sin cadenas	va ca NG
Aspecto de la colonia sobre medio IM2 + 1.5% CH ₃ OH	Circular elevado, castaño pálido	circular elevado, blanquecino	NG	
<u>Crecimiento a 55°C. sobre:</u>				
Caldo nutritivo	-	-	+	+
Caldo nutritivo + 1% CH ₃ OH	±	+	+	+
IM2 + 0.5% CH ₃ OH	+	+	-	-
IM2 + 1.5% CH ₃ OH	+	+	-	-
Glucosa	-	-	+	+
CH ₃ OH	+	+	-	-
CH ₂ CH ₂ OH	+	+	-	-
HCHO	+	+	-	-
BHM+1.5% CH ₃ OH+0.1%NaCl	+	+	-	-
BHM+5% CH ₃ OH	+	+	-	-
Recuento de placas+1.5% CH ₃ OH	bordes extendidos translúcidos.	pequeñas ampollas translúcidas	-	-

+ = evidencia visible de crecimiento, determinada por un aumento de la t
 - = no hay crecimiento; no hay evidencia visible de crecimiento.
 ± = se mantiene pero no hay evidencia visible de crecimiento adicional.
 NG = no crece en estos medios.

Cultivos de Bacillus

2 66	<u>B.licheniformis</u> <u>NRRL B-10017</u>	<u>B.coagulans</u> <u>NRRL B-1103</u>	<u>B.subtilis</u> <u>ATCC 10774</u>	<u>B.estearothermophilis</u> <u>ATCC 12987</u>
	Positivo	Positivo	Positivo	Variable
	Si	Si	Si	Si
	Si	Si	Si	Si
	0.6-0.8x1.5-3	0.6-2.5x1-5	0.7-0.8x2-3	0.6-1x2-5
	Si	Si	Si	Si
	32-45	33-45	28-40	30
	50-56	55-60	50-55	50-55
	5.2-8.2	5-7	5-8.6	4.5-6.6
	NG	NG	NG	NG
re	no requiere	tiamina,	no requiere	NG
so-	NG	biotina	NG	NG
agua		NG		
en				
tes				
3.				
	varillas, sin	varillas, sin	varillas, sin	varillas, algunas veces
	cadenas	cadenas	cadenas	filamentosas
ele	NG	NG	NG	NG
m-				
	+	+	+	+
	+	+	-	+
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
am-	-	-	-	-
rans				

nada por un aumento de la turbidez de la mezcla inicial.
 ble de crecimiento
 de crecimiento adicional.

**POOR
QUALITY**

- [Todos estos análisis se realizaron para tener una
comparación lo más directa posible entre las especies. Natu-
ralmente, como con todos los microorganismos, algunas de las
características pueden estar sometidas a cierta variación de
5 acuerdo con el m-medio y las condiciones particulares.

El material o substrato que constituye la fuente
de carbono y energía para el proceso de fermentación de esta
invencción empleando las nuevas y únicas especies de bacterias
es un compuesto o compuestos solubles en agua, que contengan
10 carbono, oxígeno e hidrógeno. El término hidrocarburo oxige-
nado es un término genérico que describe los compuestos uti-
lizables y no es necesariamente un término limitativo referi-
do al origen del substrato. Los hidrocarburos oxigenados
pueden ser alcoholes, cetonas, ésteres, éteres, ácidos y
15 aldehidos, que son de naturaleza esencialmente soluble en
agua y deben limitarse, debido a esta características, hasta
unos 10 átomos de carbono por molécula.

Son ejemplos ilustrativos el metanol, etanol, pro-
panol, butanol, pentanol, hexanol, 1,7-heptanodiol, 2-hepta-
20 nol, 2-metil-4-pentanol, ácido pentanoico, ácido 2-metilbu-
tanoico, 2-pentanol, 2-metil-4-butanol, 2-metil-3-butanol,
2-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol, 2-propanol,
ácido fórmico, ácido acético, ácido propanóico, formaldehi-
do, acetaldehido, propanal, butanal, 2-metilpropanal, ácido
25 butanoico, ácido 2-metilpropanoico, ácido pentanoico, ácido
glutarico, ácido hexanoico, ácido 2-metilpentanoico, ácido
heptanoico, ácido heptanodiol, 4-heptanona, 2-heptanona,
ácido octanoico, ácido 2-etilhexanoico, glicerina, etilengli-
col, propilenglicol, 2-propanona, 2-butanona, éter dietílico
30 [éter metiletílico, éter dimetílico, éter di-n-propílico y]

- [éter-n-propil-isopropílico, incluidas las mezclas de dos o
más cualesquiera.]

Un grupo preferido de estos materiales fuentes de
carbono y energía, debido a su solubilidad en agua, son los
5 alcoholes hidrocarbólicos alifáticos solubles en agua; toda-
vía más preferidos son los alcoholes inferiores de 1 á 4
átomos de carbono por molécula por su disponibilidad comer-
cial y todavía mejor el etanol y el metanol, siendo actual-
mente el más preferido el metanol debido al precio de coste
10 relativamente bajo de estos materiales de alimentación.

Es posible emplear mezclas de cualesquiera de es-
tos hidrocarburos oxigenados si se desea o se considera con-
veniente. Por ejemplo, un material comercial algunas veces
denominado "combustible metílico" ("methyl fuel", C. & E.N.,
15 17 de Septiembre de 1.973, pág. 23) es una mezcla de metanol
y porcentajes controlados de alcoholes superiores contien-
do hasta 4 átomos de carbono por molécula y es un substrato
adecuado.

Los gases de petróleo pueden ser oxidados y emplea-
20 dos como el metano, etano y similares, proporcionando mez-
clas de predominantemente el alcohol correspondiente así co-
mo diversas cetonas, aldehídos, éteres, ácidos y similares y
pueden utilizarse para este fin fracciones hidrocarbonadas
de diversas fuentes petrolíferas.

25 El cultivo de estas especies únicas y nuevas de
bacterias con los materiales de alimentación hidrocarbonados
oxigenados puede llevarse a cabo ventajosamente en un inter-
valo de temperaturas de 45 á 65°C y todavía mejor de 50 á
60°C, siendo la temperatura más preferida actualmente la de
30 [unos 55°C debido a que las velocidades de crecimiento son]

- [óptimas en éste caso.]

El cultivo se realiza en un medio de cultivo constituido por una solución acuosa de una sal mineral, el material fuente de carbono y energía, oxígeno molecular y, naturalmente, un inóculum inicial de la especie particular a emplear.

Las concentraciones elevadas de algunos de los substratos de carbono y energía descritos, como metanol, formaldehído o similares, pueden ser inhibidores del crecimiento microbiano satisfactorio o incluso tóxicas para los microorganismos en la fermentación empleando la nueva especie de "Bacillus". Por lo tanto, deben evitarse las concentraciones relativamente altas de substratos de manera que es conveniente mantener la concentración de substrato en el medio de fermentación a un nivel del orden de 0,01 a 5% en volumen, preferiblemente alrededor de 0,01 á 0,5% en volumen con objeto de no agotar ni inhibir las velocidades de crecimiento.

El oxígeno puede ser suministrado al medio de fermentación o caldo en cualquier forma capaz de ser asimilada fácilmente por el microorganismo inoculante. Aunque pueden utilizarse compuestos que suministren oxígeno molecular, normalmente éstos no son comercialmente prácticos. Así, el oxígeno molecular es suministrado convencionalmente como gas conteniendo oxígeno molecular, tal como aire a la presión atmosférica o elevada o aire enriquecido en oxígeno cuando resulte cómodo y se encuentre disponible, según la localidad particular de la operación del proceso SCP. En efecto, utilizando el substrato hidrocarbonado oxigenado, una parte del oxígeno necesario para el crecimiento del microorganismo es suministrada por el o-xígeno contenido en el substrato. No

- [obstante, deben suministrarse cantidades adicionales de oxígeno molecular para el crecimiento ya que la asimilación del substrato y el correspondiente crecimiento del microorganismo es en efecto un proceso de combustión. En general, se suministran al reactor alrededor de 0,1 á 10, preferiblemente 5 alrededor de 0,7 á 2,5 volúmenes por minuto de aire de contenido normal en oxígeno por volumen de líquido en el fermentador o, en función del oxígeno, los intervalos respectivos serían alrededor de 0,02 á 2,1 y 0,14 á 0,55.

10 La presión empleada para el proceso de conversión microbiológica puede variar entre amplios límites y se emplean presiones de alrededor de 0,1 á 100 atmósferas, preferiblemente de 1 á 30 atmósferas y todavía mejor una presión ligeramente superior a la atmosférica, como compromiso entre 15 el coste del equipo y la solubilidad del O_2 conseguida. Son ventajosas las presiones superiores a la atmosférica porque estas presiones pueden aumentar la concentración de oxígeno disuelto en la mezcla acuosa de fermentación, lo que a su vez puede aumentar la velocidad de crecimiento celular. Se 20 prefieren presiones superiores a la atmosférica a temperaturas de fermentación más altas, a las cuales la solubilidad del oxígeno disminuye. Los medios de fermentación llenos de espumas suelen favorecer la transferencia de oxígeno necesaria para obtener altas densidades celulares y grandes velocidades de crecimiento. 25

Las dos especies unidas de "Bacillus" de éste descubrimiento requieren nutrientes minerales y una fuente de nitrógeno asimilable además del oxígeno y de las fuentes de carbono y de energía descritas. La fuente de nitrógeno puede 30 ser cualquier compuesto nitrogenado capaz de liberar nitrógeno [

- no en una forma adecuada para la utilización metabólica por el organismo. Aunque pueden emplearse diversos compuestos como fuente de nitrógeno orgánico tales como otras proteínas urea o similares, habitualmente resultan más económicas y prácticas las fuentes inorgánicas de nitrógeno. Los compuestos nitrogenados inorgánicos adecuados son el amoníaco, , 5 hidróxido amónico, diversas sales amónicas tales como citrato amónico, fosfato amónico, sulfato amónico, pirofosfato amónico u otros diversos compuestos individuales. El amoníaco 10 gaseoso es cómodo y puede ser empleado haciéndole barbotear a través del medio acuoso de fermentación en cantidades adecuadas.

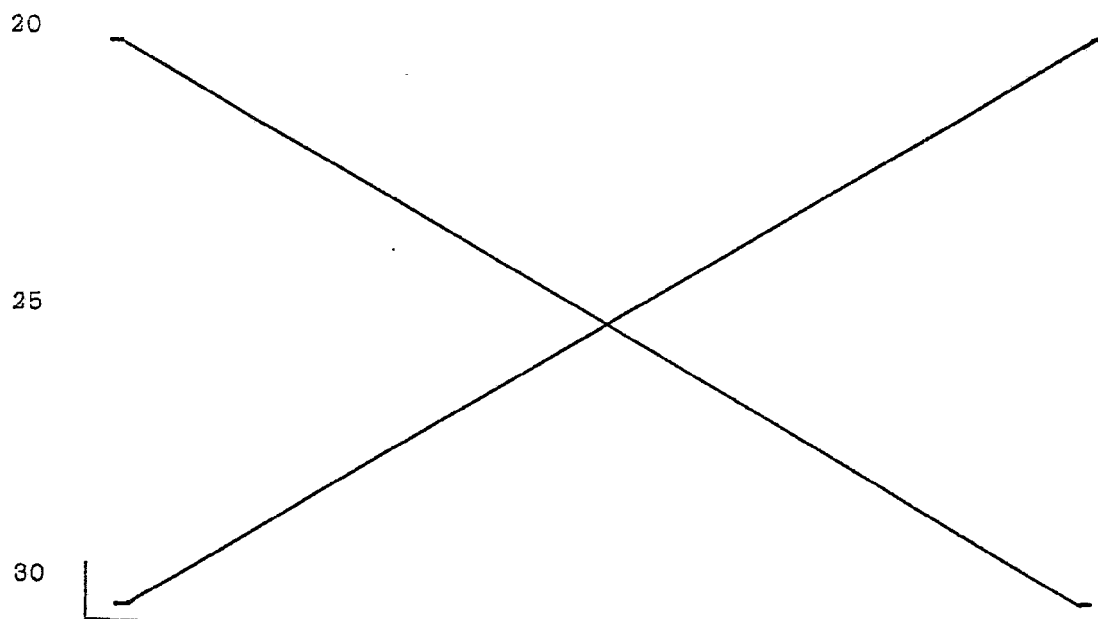
El intervalo de pH en la mezcla acuosa de fermentación microbiana debe encontrarse aproximadamente entre 5 y 9 15 y todavía mejor entre 6 y 8. Los microorganismos únicos de éste descubrimiento en el procedimiento de la invención parecen preferir un pH comprendido aproximadamente entre 6 y 7.5. Estos microorganismos prefieren más especialmente un pH de 6,2 á 6.8 aproximadamente para el NRRL B-8065 y de 6.2 á 20 6.5 para el NRRL B-8066, en lo que se denominan medios IM2. Las preferencias de pH de los microorganismos dependen de los medios empleados y por lo tanto varían algo al cambiar de medio.

25 Cuando la fuente de carbono y energía es o contiene un aldehído, en cantidades potencialmente perjudiciales para el microorganismo, los efectos perjudiciales del aldehído pueden ser evitados tratando primero el substrato con una cantidad adecuada de un compuesto nitrogenado, preferiblemente amoníaco, hidróxido amónico u otro compuesto amónico, 30 en una proporción de alrededor de 0,01 a 10 equivalentes mo-

- [ares de dicho compuesto nitrogenado por cada mol de aldehí-
do. Después de éste substrato tratado no sólomente es la
fuente de carbono y energía sino que también contiene la
fuente necesaria de nitrógeno en su totalidad o en parte.

5 Además del oxígeno, nitrógeno y fuentes de carbono
y energía, es necesario suministrar las cantidades precisas
en las proporciones apropiadas de nutrientes minerales selec-
cionados a los medios de alimentación, con objeto de garanti-
zar un crecimiento apropiado de microorganismo y hacer máxima
10 la asimilación del hidrocarburo oxidado por las células en el
proceso de conversión microbiana.

 Aparentemente, los minerales esenciales son provis-
tos por una fuente de fosfato u otros iones de fósforo, mag-
nesio, calcio, rodio, manganeso, molibdeno y cobre. La fórmu-
15 la indicada a continuación puede ser utilizada para cultivar
las nuevas especies de "Bacillus" de éste descubrimiento e in
vención, aunque crecen también en otros substratos que no
contienen metanol. Lo siguiente se da como guía a los exper-
tos en la materia:



Medio IM2 (sólido)

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
KH_2PO_4	2.0 g
5 K_2HPO_4	3.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
NaCl	0.1 g
10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g
Agar	15 g
Solución de minerales traza (a)	0.5 ml
Agua destilada	1000 ml
Metanol estéril ^(b) para producir	1.5 vol %

15 (a) ver la fórmula siguiente.
 (b) agregado inmediatamente antes del uso.

Para un medio líquido, simplemente se omite el agar

Solución de minerales traza

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad</u>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.06 g
20 KI	0.08 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.3 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
H_3BO_3	0.02 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
25 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.8 g
Agua destilada	1,000g
H_2SO_4 (concentrado)	3 ml.

30

Otros materiales como extractos de levadura, vitaminas, biotina y similares u otros factores de crecimiento pueden ser agregados típicamente en las cantidades traza conocidas en la técnica de la fermentación.

5 El cultivo de las nuevas especies de "Bacillus" de acuerdo con la invención puede realizarse en forma discontinua aunque preferiblemente según un proceso continuo, por métodos conocidos en fermentación pero todavía mejor en un reactor de fermentación lleno de espuma. Ciertamente, el proceso continuo presenta varias ventajas en las operaciones comerciales para la producción de grandes cantidades de células microbianas y por lo tanto es la forma preferida de realizar la invención.

15 Ya sea en una operación discontinua o en la operación continua preferida, todo el equipo, reactor o medios, vasija o contenedor de fermentación, tuberías, dispositivos de circulación o refrigeración adecuados y similares son esterilizados, habitualmente empleando vapor de agua por ejemplo a unos 250°F (121°C) durante varios minutos, por ejemplo 20 alrededor de 15 minutos. El reactor esterilizado es inoculado con un cultivo del microorganismo específico en presencia de todos los nutrientes requeridos, incluido el oxígeno y la alimentación hidrocarbonada oxigenada.

25 En un procedimiento continuo, cuando el cultivo comienza a crecer, se mantiene la introducción continua de aire, medio nutriente, fuente de nitrógeno si se agrega independientemente y material de alimentación oxigenado tal como alcohol. La velocidad de adición de las diversas corrientes puede variar para obtener un crecimiento celular tan rápido como sea posible, teniendo en cuenta la utilización

30

- eficiente del hidrocarburo oxigenado, de manera que se alcance el objetivo de un rendimiento máximo de peso celular por peso de material fuente de carbono y energía cargado. La velocidad de alimentación de la fuente de carbono y energía debe ser ajustada de manera que las cantidades alimentadas al fermentador sean esencialmente iguales a la velocidad de consumo por el organismo, para evitar sobrealimentaciones en especial de materiales tóxicos, tales como alcoholes o aldehidos, que pueden inhibir el crecimiento o incluso destruir los microorganismos. Habitualmente se producen condiciones satisfactorias cuando en el efluente que sale del fermentador queda poco o nada de material fuente de carbono y energía, aunque puede obtenerse un control satisfactorio observando el contenido en material fuente de carbono y energía del efluente del fermentador y manteniéndose en el nivel bajo deseado tal como alrededor de 0,1 á 0,5% en volumen. Naturalmente, cualquiera de las corrientes de alimentación puede ser agregada discontinua o continuamente, según se desee o resulte conveniente.

20 Debe mantenerse una instrumentación que mida la densidad de las células, el pH, el contenido de oxígeno disuelto, la concentración de alcohol u otro material de alimentación en el fermentador, la temperatura, las velocidades de las corrientes de entrada y salida y similares. Se prefiere que los materiales introducidos al fermentador sean esterilizados antes de su introducción en el mismo. Cuando el material de alimentación hidrocarbonado oxigenado es un material capaz de esterilizar a otros, como el metanol, etanol, o formaldehido, en algunos casos puede ser conveniente agregar este componente a las otras corrientes, por ejemplo el

- [medio mineral, en cantidades esterilizantes y con ello cumplir varios fines sin necesidad de una esterilización independiente de los medios minerales por ejemplo por la acción del calor o similares.]

5 El tipo de fermentador empleado no es crítico en la práctica del proceso de fermentación de la invención empleando las especies de este procedimiento, aunque actualmente se prefiere la operación en un fermentador lleno de espuma. La mejor forma de conseguir una alta productividad de cultivos puros de los termófilos únicos de esta invención con una
10 alimentación hidrocarbonada oxigenada es en un proceso continuo cuando el proceso se produce en un sistema lleno de espuma. Los cultivos puros a las temperaturas de fermentación aquí recomendadas alcanzan grandes velocidades de crecimiento
15 y producen una espuma muy estable, Naturalmente, deben controlarse las velocidades de crecimiento para evitar que la espuma salga del fermentador, lo que podría reducir el volumen de líquido y producir algunas pérdidas del contenido del fermentador. Debe evitarse la adición de antiespumantes, en
20 la medida de lo posible, ya que los antiespumantes, como las siliconas, pueden ser perjudiciales para la concentración de oxígeno disuelto a las elevadas temperaturas recomendadas y puede hacer que el organismo crezca a una velocidad menor, reducir la productividad o incluso morir. La espuma producida
25 con estas especies no es perjudicial para el crecimiento y es claramente beneficiosa para mantener los organismos en un sistema con gran concentración de oxígeno disuelto. El favorecimiento de éste proceso de espumación en un fermentador diseñado para estimular y mantener la espuma producida, es
30 [beneficioso para el procedimiento de conseguir la mayor]

- [transferencia de O_2 necesaria para mantener la elevada densi-
dad celular y la rápida velocidad de crecimiento que estos
organismos termofílicos requieren. El proceso de utilizar
un fermentador lleno de espuma con los termófilos únicos de
5 esta invención que consumen hidrocarburos oxigenados y produ-
cen grandes cantidades de espuma da lugar a la máxima efi-
ciencia de producción en el proceso SCP.

La operación del fermentador lleno de espuma es es-
pecialmente adecuada para realizar procesos de fermentación
10 en los que deben mantenerse grandes cantidades de gases en
contacto íntimo con la fase líquida para obtener una reacción
a lo largo de superficies relativamente grandes de interfa-
ses de contacto. Así, la fermentación es mejorada y la
transmisión de calor es mejorada también en lo que se refiere
15 al control, uniformidad y evitación de puntos calientes.

Un modelo actualmente preferido de fermentador puede
ser del tipo representado en la figura 1) de la página 37 de
la obra "Process Biochemistry", Junio 1.972, al que puede
agregarse un conducto para introducir un gas conteniendo
20 oxígeno molecular en la vasija en cualquier punto convenien-
te, preferiblemente dentro del tubo propulsor e inmediatamen-
te por encima del dispositivo mezclador ya que la acción
aspirante del dispositivo -mezclador puede entonces ser em-
pleada ventajosamente para favorecer la introducción del
25 aire en el contenido de la vasija. Este tipo de fermentador
opera eficazmente con su contenido convertido prácticamente
por completo en una espuma o en una emulsión de baja densi-
dad, alcanzándose velocidades de transferencia de oxígeno
muy altas.

30 [Otro tipo de fermentador que puede emplearse es el]

fermentador con inyección de aire comprimido que está descrito en el artículo de Wang y otros, en "Proceedings Eighth World Petroleum Congress", vol. 5, págs. 149-156 (1971) publicado por Applied Science Publishers Ltd., Londres, Inglaterra.

Todavía otro tipo de fermentador que puede ser utilizado es el fermentador de ciclo a presión descrito en la página 63 de "Chemical Engineering", 7 de Enero de 1974.

Finalmente, otro tipo de fermentador que es adecuado es el conocido tanque provisto de un agitador de paletas y un dispositivo de aireación sumergido. Un fermentador de éste tipo se describe en la patente estadounidense No. 2.983.652.

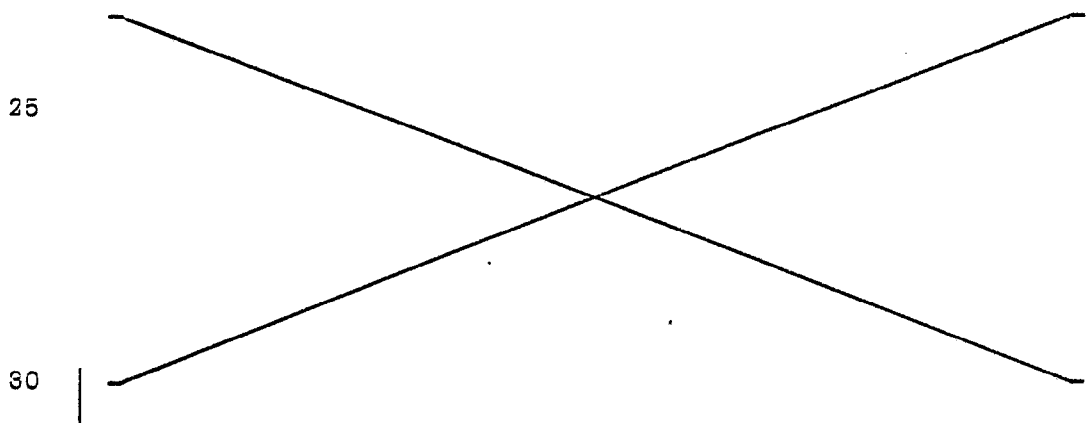
Cuando no se emplea una forma de fermentación llena de espuma, puede ser necesario utilizar un agente antiespumante para realizar el proceso de fermentación de esta invención. Los agentes antiespumantes adecuados y los métodos de aplicación de los mismos son muy conocidos en la técnica de la fermentación, aunque esta forma es mucho menos preferida con las especies únicas de ésta invención.

Los productos celulares y extracelulares del cultivo de las nuevas especies de "Bacillus" sobre los substratos de acuerdo con el procedimiento de esta invención pueden ser recuperados por medios convencionales. Las células pueden ser separadas del efluente del fermentador por centrifugación, filtración o similares. El efluente exento de células puede ser tratado después con acetona o con un alcohol inferior tal como metanol o etanol para precipitar cualquier material polimérico producido extracelularmente. El efluente exento de células también puede ser tratado por extracción

- [con disolvente y/o extracción con base para recuperar si se]
desea otros productos extracelulares como pigmentos, vitami-
nas o ácidos orgánicos producidos durante el proceso de cul-
tivo. Las células microbianas habitualmente son eliminadas
5 por el calor o por medios químicos y esto puede hacerse an-
tes o después de la separación de las células del efluente
del fermentador. Las células bacterianas constituyen una
valiosa fuente de proteína para el hombre y los animales.
Para el consumo humano, las células pueden ser tratadas para
10 reducir el contenido en ácido nucleico pero para fines de
alimentación animal este tratamiento no parece necesario.

EJEMPLO I

Se obtuvieron varios cultivos de microorganismos
termofílicos conocidos de dos depósitos de cultivos, el
15 Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois
del Departamento de Agricultura de Estados Unidos y la Ame-
rican Type Culture Collection ATCC, Washington, D.C. Estos
cultivos se recibieron en estado liofilizado. En los culti-
vos se ensaya el crecimiento a 55°C en varios medios dife-
20 rentes. Los resultados de estos ensayos se encuentran en la
Tabla I dada a continuación. Los cultivos empleados son los
siguientes :



	<u>Especies</u>	<u>No de depósito</u>
	"Bacillus subtilis"	ATCC 10774
	"Bacillus stearothermophilis"	ATCC 12987
	"Bacillus stearothermophilis"	NRRL B1102
5	"Bacillus coagulans"	NRRL B1103
	"Bacillus coagulans"	NRRL B1168
	"Bacillus licheniformis"	NRRL B1001

T A B L A I

		Crecimiento + o - en el medio No.				
10	<u>Cultivo No.</u>	<u>1(a)</u>	<u>2(b)</u>	<u>3(c)</u>	<u>4(d)</u>	<u>5(e)</u>
	NRRL B1001	+	+	+	+	-
	NRRL B1103	+	+	+	+	-
	ATCC 12987	+	+	+	+	-
	NRRL B1168	+	+	+	+	-
	NRRL B1102	-				
	ATCC 10774	+	-	-	-	

- 15
- (a) caldo nutritivo (CN)
 - (b) CN + 1% de metanol
 - (c) CN (1/2 de concentración) + 1% de metanol
 - (d) CN (1/4 de concentración) + 1% de metanol
 - (e) Medio IM2 + 0,5% de metanol

El caldo nutritivo utilizado antes es un medio de cultivo convencional con 3 g/l de extracto de buey y 5 g/l de peptona. El medio IM2 es el medio antes descrito a excepción de que no contiene agar en estas operaciones que utilizan medios líquidos. El NRRL B1102 no crece bien incluso en caldo nutritivo. El ATCC 10774 no crece bien en presencia de metanol (Medio 2). Aunque los otros cultivos crecen en presencia de metanol, evidentemente son incapaces de utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía para su crecimiento. Estos resultados contrastan espectacularmente con los interesantes resultados obtenidos con las especies únicas de "Bacillus" empleadas en el procedimiento de esta invención ya que estas especies únicas de "Bacillus" son ca-

- paces de utilizar eficientemente el metanol como su única fuente de carbono y energía.

Se realizó un proceso continuo de fermentación de acuerdo con el procedimiento de la invención. El inóculum para la operación estaba constituido por 500 ml de una dispersión acuosa de células de cultivo No 72 NRRL B-8066, que había sido cultivado durante 24 horas en el medio BH-M con un 1,5% en volumen de metanol :

Medio BH-M

Componente	Cantidad
KH_2PO_4	2.0 g/l
K_2HPO_4	3.0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g/l
Solución de minerales traza*	10 ml/l

* La solución de minerales traza es-taba constituida por los siguientes materiales :

Componente	Cantidad
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02 g/l
H_2SO_4 (concentrado)	1 ml/l

El inóculum antes descrito se agregó a un fermentador provisto de medios de agitación y aireación y conteniendo 2 litros del medio preparado con agua corriente, descrito a continuación :

30

Medio FM-12

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
H ₃ PO ₄ (85%)	2,0 ml
KCl	1,0 g
5 MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Solución de minerales traza*	10,0 ml
Agua destilada hasta	1 litro
10 *	Esta solución de minerales traza fué formulada de acuerdo con la receta dada a continuación :

Solución de minerales traza

<u>Componente</u>	<u>Cantidad, g</u>
15 CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,06
KI	0,08
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4,80
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,00
20 H ₃ BO ₃	0,02
H ₂ SO ₄ (concentrado)	3 ml
Agua destilada hasta	1 litro

25 En contenido en metanol fué inicialmente 1,5% (en volumen), el pH alrededor de 6,7 y la temperatura alrededor de 55°C. La velocidad de agitación del contenido fué de unas 1000 r.p.m. y el aire se introdujo a razón de unos 2 litros por minuto. Se agregó continuamente hidróxido emónico para mantener el pH aproximadamente entre 6,7 y 6,9 y también pa-
30 ra proporcionar una fuente de nitrógeno.

Después de observar un buen crecimiento del inócu-
lum, se inició la adición continua del medio nutritivo con
un 5% en volumen de metanol y se retiró el volumen correspon-
diente de efluente del fermentador. La velocidad de alimen-
tación para la mezcla nutriente variaba aproximadamente en-
tre 150 y 800 ml/hora durante el curso de la operación de
unas 500 horas. El tiempo de retención promedio para las cé-
lulas en el fermentador varió aproximadamente entre 2,4 y 5
horas. El efluente del fermentador fué muestreado de vez en
cuando para recuperar algunas de las células que se secaron,
pesaron y sometieron a un análisis de proteínas. Las muestras
de efluente se procesaron para recuperar sólomente las célu-
las, es decir, no se analizaron las sustancias solubles. Los
valores de la concentración celular oscilaban aproximadamen-
te entre 12 g/l (células secas) al principio de la operación
(25 horas) y 18 g/l al cabo de 190 horas y unos 24 g/l hacia
el final de la operación. La conversión del metanol en célu-
las recuperables es del 44% del cargo. El contenido en pro-
teínas para una muestra de células tomada durante el curso de
esta operación ha sido indicado anteriormente en la discusión
que describe la recuperación del producto.

Los resultados anteriores indican que la nueva es-
pecie de "Bacillus" NRRL B-8066 de esta invención puede ser
fácilmente cultivada de forma continua a 55°C con metanol co-
mo fuente de energía y carbono. Además, las células de esta
especie han demostrado contener una gran concentración de
proteínas.

EJEMPLO II

Se realizó otra operación en fermentador continuo
utilizando el cultivo NRRL B-8066 del Ejemplo I. En esta

- [operación, el fermentador se inoculó con 500 ml de una dis-
persión acuosa del cultivo que había sido cultivado durante
26 horas en un medio IM2 más 1,5% en volumen de metanol :

Medio IM2

5	<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
	KH_2PO_4	2.0 g/l
	K_2HPO_4	3.0 g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04g/l
10	NaCl	0.1 g/l
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g/l
	Solución de minerales traza*	0.5 ml/l

* La solución de minerales traza estaba constituida por los
siguientes materiales, para 1 litro de solución acuosa :

15

Solución de minerales traza

	<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.06 g
	KI	0,08 g
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.80 g
20	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.30 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.00 g
	H_3BO_3	0.02 g
	H_2SO_4 (concentrado)	3 ml

25

El inóculum descrito anteriormente se agregó a un
fermentador del mismo tipo descrito en el Ejemplo I. El fer-
mentador contenía 2 litros del mismo medio, FM-12, descrito
en la fermentación del Ejemplo I a excepción de que sólamen-
30 [te se agregaron al medio 5 ml por litro de la solución de]

- [minerales traza anterior.]

El contenido en metanol fué inicialmente limitado a alrededor de 1,5% en volumen, el pH era alrededor de 7,1 y la temperatura alrededor de 53°C. Durante las dos prime-
5 ras horas, la agitación y los volúmenes de aire se aumentaron lentamente hasta 800 r.p.m. y 2 litros por minuto, respectivamente. Se agregó hidróxido amónico en la forma descrita en el Ejemplo I para mantener el pH en un intervalo comprendido aproximadamente entre 7,0 y 7,2 así como para
10 proporcionar una fuente de nitrógeno.

Después de haber establecido un buen crecimiento del inóculum durante las primeras 24 horas, se inició la adición continua del medio nutritivo con un 7,5% en volumen de metanol y 0,05 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$ y se retiró el volumen
15 correspondiente de efluente del fermentador. La velocidad de alimentación a la mezcla del medio nutritivo fué alrededor de 200 á 400 ml/hora durante la operación que duró unas 94 horas. El tiempo de retención promedio en el fermentador varió entre 3 y 5 horas aproximadamente. El efluente del
20 fermentador fué muestreado de vez en cuando para recuperar y secar las células que se pesaron. Las muestras de efluente fueron procesadas para recuperar sólomente las células, es decir, los solubles no fueron analizados. Las concentraciones celulares al cabo de 24 horas oscilaban entre 17 y 26
25 g/l (células secas). La conversión del metanol en células recuperables fué alrededor del 43% del cargado.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto de nuevo que puede obtenerse un buen rendimiento de células microbianas a partir de la nueva especie de "Bacillus", emplean-
30 [do metanol como única fuente de energía y carbono a elevada]

- [temperatura de fermentación.]

EJEMPLO III

Se realizó una fermentación continua con el cultivo 47, NRRL B-8065.

5 Se utilizó un fermentador del mismo tipo anteriormente descrito. El fermentador contenía 2 litros del medio FM-12 descrito en el Ejemplo II pero en éste caso preparado con agua desionizada y se cargó con 500 ml de una dispersión acuosa de cultivo 47, NRRL B-8065, cultivado durante 11 horas sobre el mismo inóculum del medio IM2 descrito en el
10 Ejemplo II, con un 1,5% en volumen de metanol.

El contenido de metanol era inicialmente 1,5% en volumen, el pH alrededor de 6,45 y la temperatura se mantuvo alrededor de 54°C. Como en los Ejemplos I y II, se agregó
15 hidróxido amónico para mantener el pH a 6,3-6,6 aproximadamente así como para proporcionar una fuente de nitrógeno. La agitación y el caudal de aire fueron aumentados gradualmente hasta 400 r.p.m. y 0,5 litros por minuto respectivamente, durante un periodo de unas 7 horas. Al cabo de unas 11 horas,
20 se inició la adición continua del medio nutritivo, FM-12 preparado con agua corriente, con un 2,5% en volumen de metanol y además 1 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de K_2HPO_4 y una pequeña cantidad de agente antiespumante. Al cabo de 28 horas, se modificó la alimentación proporcionando $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ adicional para
25 duplicar su concentración en la alimentación. Este ajuste parece estimular hasta cierto punto la absorción de oxígeno por las células. Estas especies únicas parecen presentar unas necesidades relativamente altas de Mn^{++} para su crecimiento.
óptimo.

30 [En el transcurso de las 101,5 horas que duró la]

- [operación, se añadieron cantidades adicionales de los otros minerales traza pero ninguno tenía al parecer un efecto estimulante sobre la velocidad de crecimiento de las células. Además, de aire, el fermentador también fué cargado al cabo de 28 horas con oxígeno a una velocidad creciente de 0,12 hasta 0,4 litros por minuto. La velocidad de agitación fué correspondientemente aumentada desde 400 hasta 800 r.p.m. durante éste periodo. El efluente fué muestreado de vez en cuando para recuperar las células, secarlas y pesarlas.

10 La velocidad de alimentación del medio osciló aproximadamente entre 300 ml/hora al cabo de 28 horas y unos 850 ml/h. al cabo de 71 horas hasta 1070 ml/hora a las 95 horas. El tiempo de permanencia de las células osciló aproximadamente entre 1,8 y 2,5 horas durante las últimas 30 horas.
15 Las concentraciones celulares oscilaron aproximadamente entre 7 y 10 g/litro (células secas) y la conversión de metanol en células recuperables fué alrededor del 50% del cargado.

20 Los resultados anteriores ponen de manifiesto que el cultivo No. 47, NRRL B-8065, también proporciona un buen rendimiento de células microbianas cuando se cultiva en metanol como única fuente de carbono y energía, a temperatura de fermentación relativamente altas.

EJEMPLO IV

25 El contenido en proteína cruda de las células de la nueva especie de "Bacillus" de éste descubrimiento está comprendido aproximadamente entre 70 y 85% en peso. La riqueza de proteína cruda se obtuvo multiplicando el porcentaje en peso de nitrógeno (análisis de Kheldhal) de las células secas por el factor 6,25. Sometiendo estas células se-

30 [

- [cas a hidrólisis, seguida de análisis de los aminoácidos por
 cromatografía de gases, se observa que el contenido en pro-
 teínas está comprendido aproximadamente entre 55 y 70% en pe-
 so. Una distribución de aminoácidos para una muestra de célu-
 5 las bacterianas preparadas de acuerdo con esta invención
 utilizando el cultivo No. 72, NRRL B-8066, es la siguiente:--

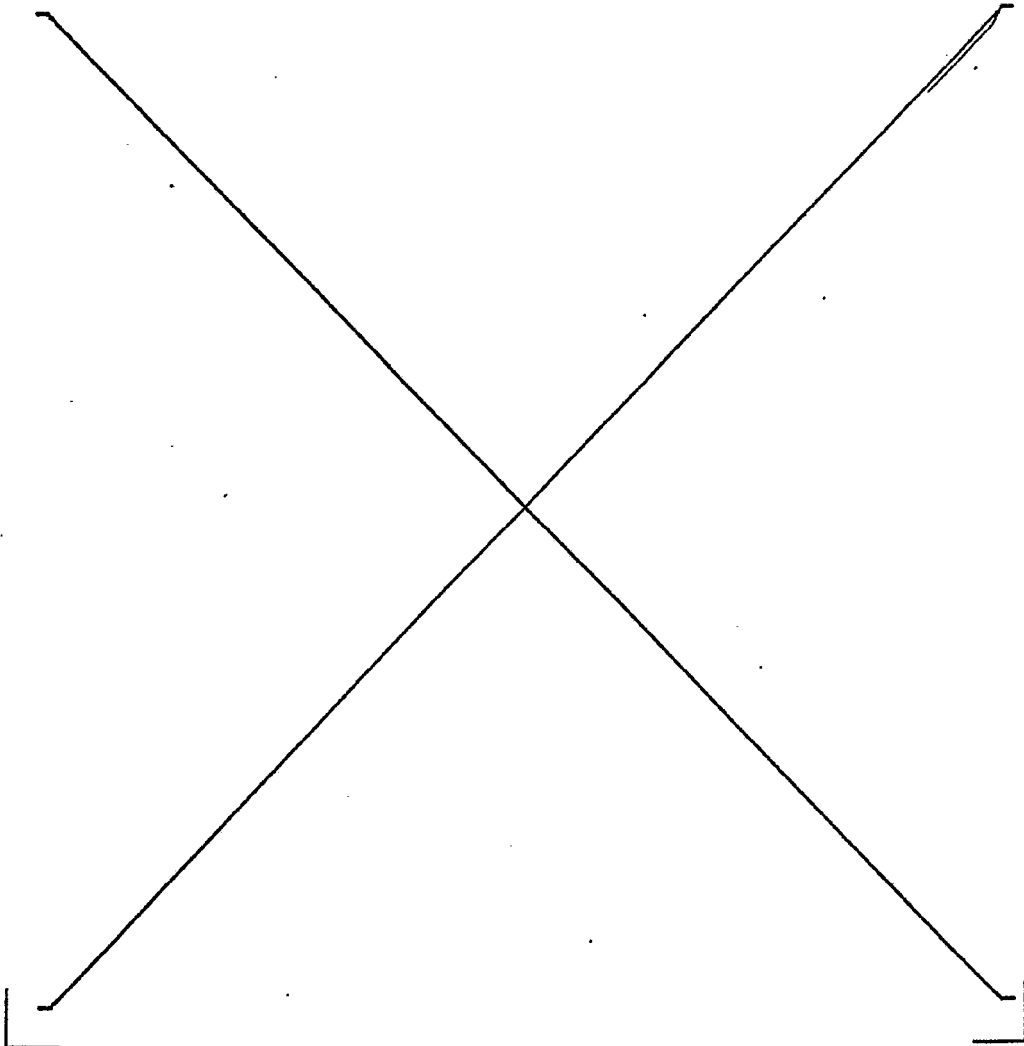
	<u>Aminoácidos esenciales</u>	<u>Células secas g/100 g.</u>
	leucina	5,52
	isoleucina	4,68
10	lisina	5,36
	metionina	1,38
	cistina	0,05
	treonina	2,93
	fenilalanina	2,72
	tirosina	2,00
	triptofano	0,79
	valina	5,25
	<u>Aminoácidos no esenciales</u>	<u>Células secas g/100 g.</u>
15	alanina	5,83
	arginina	2,93
	ácido espártico	6,38
	glicina	3,76
	ácido glutámico	9,95
	histidina	1,18
	prolina	2,37
	serina	1,96
20	Total	65,04
	aminoácidos esenciales totales	30,68

Puede observarse que el contenido de aminoácidos
 sulfurados, v.g. cistina y metionina, es relativamente bajo.
 De hecho, algunas muestras de células procedentes de la es-
 25 pecie "Bacillus" anterior han presentado un valor de 0,00 g
 de cistina por 100 g de células secas. Esta situación no es
 desusada en los procesos de obtención de proteína de una so-
 la célula (SCP) y puede ser ajustada simplemente añadiendo
 cantidades adecuadas de cistinas o metioninas sintéticas a
 30 [la ración dietética que utiliza esta SCP.]

- [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.

5
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.

10
15
20
25
30
[]



REIVINDICACIONES

1). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular que comprende el cultivo de un microorganismo en un medio acuoso utilizando nutrientes minerales, un hidrocarburo oxigenado como una fuente de carbono y energía, y una fuente de nitrógeno asimilable bajo condiciones de fermentación aerobias, y recuperar el microorganismo resultante como un material proteico de una sola célula, caracterizado porque el microorganismo cultivado es de la especie "Bacillus" NRRL B-8065 ó NRRL B-8066.

2). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular según la reivindicación 1), caracterizado porque el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de fermentación que oscila entre los 45º y los 65ºC.

3). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular, según la reivindicación 2), caracterizado porque la temperatura oscila entre los 50º y los 60ºC.

4). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindicaciones 1) á 3), caracterizado porque dicha materia de hidrocarburo oxigenado y fuente de carbono y energía comprende uno o más alcoholes, cetonas, ésteres; éteres, ácidos, o aldehidos, y porque es substancialmente soluble en agua y tiene hasta 10 átomos de carbono por molécula.

5). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular, según la reivindicación 4), caracterizado porque dicho hidrocarburo oxigenado está seleccionado entre el grupo formado por metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, 1,7-heptanodiol, 2-heptanol, 2-metil-4-pentanol, ácido pentanoico, ácido 2-metilbutanoico, 2-pen

- [tanol, 2-metil-4-butanol, 2-metil-3-butanol, 2-butanol,
2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol, 2-propanol, ácido
fórmico, ácido acético, ácido propanoico, formaldehído,
acetaldehído, propanal, butanal, 2-metilpropanal, ácido buta
5 noico, ácido 2-metil-propanoico, ácido pentanoico, ácido
glutárico, ácido hexanoico, ácido 2-metilpentanoico, ácido
heptanodioico, ácido heptanoico, 4-heptanona, 2-heptanona,
ácido octanoico, ácido 2-etilhexanoico, glicerina, etilengli
col, propilenglicol, 2-propanona, 2-butanona, éter dietílico,
10 éter metilético, éter dimético, éter di-n-propílico,
éter n-propil-isopropílico, o mezclas de los mismos.

6) Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según la reivindicación 4), caracteri-
zado porque dicha materia de fuente de carbono y energía
15 comprende un alcohol hidrocarbilo monohídrico alifático solu
ble en agua.

7). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según la reivindicación 6), caracteri-
zado porque dicho alcohol contiene de 1 á 4 átomos de carbo-
20 no por molécula.

8). Un procedimiento para la producción de materia
proteico unicelular, según la reivindicación 7), caracteri-
zado porque dicho alcohol es etanol o metanol.

9). Un procedimiento para producción de materia
25 proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindica-
ciones anteriores, caracterizado porque la materia de fuente
de carbono y energía se mantiene a una concentración de 0,01
al 5% en volumen en el medio de cultivo.

Re
30 [10). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindica-


- [ciones anteriores, caracterizado porque el cultivo incluye]
condiciones de fermentación que utilizan de 0,02 á 2,1 volú-
menes de oxígeno por minuto por volumen de líquido en dicho
medio de cultivo y porque éste se mantiene a una presión que
5 oscila entre 0,1 y 100 atmósferas y un pH dentro de la gama
comprendida entre 5 y 9.

11). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según la reivindicación 10), caracteri-
zado porque el oxígeno se suministra por lo menos en parte
10 en forma de aire.

12). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindica-
ciones anteriores, caracterizado porque el hidrocarburo oxi-
genado contiene uno o más aldehidos y se trata con amoniaco
15 o un compuesto amónico en una relación de 0,01 á 10 equiva-
lentes molares por mol de aldehido antes del empleo en dicho
medio de cultivo.

13). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindica-
20 ciones, caracterizado porque el medio de cultivo se trata
con un compuesto de manganeso durante el cultivo.

14). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindica-
ciones anteriores, caracterizado porque el cultivo se lleva
25 a cabo en un fermentador substancialmente lleno de espuma
bajo condiciones de fermentación llenas de espuma.

15). Un procedimiento para producción de materia
proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindica-
ciones anteriores, caracterizado porque el microorganismo
30  utilizado es el de la especie NRRL B-8065, la materia emisora]

- [de carbono y energía comprende metanol y se lleva a cabo una fermentación a un pH entre 6,2 y 6,8.]

5 16). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindicaciones 1) á 14), caracterizado porque el microorganismo utilizado es el de la especie NRRL B-8066, la materia de la fuente de carbono y energía comprende metanol y la fermentación se lleva a cabo a un pH entre 6,2 y 6,5.

10 17). Un procedimiento para producción de materia proteico unicelular, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza hidróxido amónico como fuente de nitrógeno.

18). "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCCIÓN DE MATERIA PROTEICO UNICELULAR".

15 Todo según queda expuesto en la presente Memoria, que consta de treinta y cinco hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, 29 de Septiembre de 1.976.

P.A.

20

Modesto Polo
P. P.

25

30

129