

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO	(10) A1
	476091	
	(23) FECHA DE PRESENTACION	
	18.DIC.1978	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
77/17449	7.6.77	Francia

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	470.549

(54) TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO DE SELECCION DE CARACTERES INTERESANTES DE UN MICROORGANISMO"

(71) SOLICITANTE (S)
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
149, rue de Grenelle, 75007 París, Francia

(72) INVENTOR (ES)
Thadée Joseph Staron

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 70.523)

IFG

BAD ORIGINAL

1 El presente invento concierne a un procedimiento
para la obtención de proteínas alimenticias de origen fúngi
co o a partir de organismos pluricelulares, en particular
por empleo de un nuevo organismo pluricelular. Concierne
5 igualmente a las proteínas alimenticias así obtenidas. Ade-
más tiene como objeto un dispositivo de fermentación que es
igualmente conveniente para la realización del procedimien-
to del invento. Igualmente, tiene como objeto un procedi-
miento de mutación de micro-organismos y en particular de
10 hongos.

Los micro-organismos (bacterias, levaduras, hon-
gos) intervienen en la preparación de alimentos humanos y
animales actuando por sus enzimas y son utilizados para la
producción industrial de moléculas orgánicas, muchas de las
15 cuales son metabolitos banales o comunes (etanol, ácido acé-
tico, ácido cítrico, glicerina, lisina, ácido glutámico,
ácido ascórbico, etc. ...).

Desde el comienzo de la era pastoral, los micro-
-organismos simbióticos han sido cultivados sobre diversos
20 sustratos (melazas, bagazos, suero láctico, líquidos bisul-
fíticos, etc.), con vistas a la revalorización de los sub-
productos y a la obtención de biomasas. Las biomasas eran
utilizadas sobre todo en la alimentación de animales como
aportación de vitaminas, de sales minerales y de proteínas.

25 Por razones coyunturales, el desarrollo de estas
prácticas ha quedado limitado durante largo tiempo. Las
principales causas de este estancamiento han sido: las irre-
gularidades en la calidad, las dificultades en el control y
dominio de los cultivos y en el mantenimiento y conserva-
30 ción de las cepas, la aparición de manantiales de proteínas.

1 y de vitaminas más baratos, la reestructuración industrial, como consecuencia del descubrimiento de recursos y yacimientos fósiles, que ha acelerado el desarrollo agrícola, etc.

5 Estos últimos 20 años, las producciones industriales de biomasa han conocido una reactivación muy notable.

Los elementos que han motivado dicho resurgimiento y reactivación son principalmente: los progresos de la biología molecular, el descubrimiento de micro-organismos que consumen manantiales energéticos no convencionales (por ejemplo para 10 finas), la necesidad de la resorción de efluentes agroalimenticios cada vez más voluminosos, las necesidades crecientes de proteínas, la aparición de nuevas tecnologías que tienden a reducir el consumo de energía, etc.

15 A partir de 1960 se ha desarrollado una intensa investigación acerca del cultivo de las biomasa. Se ha relacionado con levaduras de alcanos, bacterias que oxidan al metanol, espirulinas que crecen sobre medios carbonatados, hongos susceptibles de metabolizar diferentes tipos de efluentes.

20 Los ensayos nutritivos realizados con numerosas especies animales han puesto en evidencia el elevado valor nutritivo y la inocuidad de las biomasa así obtenidas.

25 Los micro-organismos susceptibles de producir proteínas alimenticias son las bacterias y los hongos (levaduras y hongos filamentosos); deben poseer las siguientes características:

- una buena especificidad frente a los sustratos;
- un corto tiempo de duplicación (de 20 minutos a 5 horas);
- una elevada eficacia energética (100 gramos de

- 1 hidratos de carbono = 25 a 32 gramos de proteínas);
- un crecimiento a las temperaturas exigidas (de 20°C de a 50°C);
 - 5 - un crecimiento a valores extremados de pH;
 - un crecimiento con concentraciones reducidas o elevadas de sustratos;
 - deben realizar un agotamiento máximo de los medios (reducción de la D Q O y de la D P O₅ de 90 a 98%);
 - 10 - el cosechado y el secado de la biomasa deben ser fáciles;
 - el contenido de proteínas debe ser elevado (40-65%);
 - 25 - los contenidos de ácidos nucleicos y de paredes nucleares deben ser reducidos;
 - los gérmenes empleados no deberán poseer poder patógeno (virulencia y excreción de toxinas) y no deben producir bacteriocinas ni desprender
 - 20 olores desagradables;
 - el coeficiente de eficacia protídica (C.E.P.) de la biomasa debe ser elevado.

Se ha encontrado, por primera vez por lo que sabe la solicitante, que un microorganismo filamentoso podía servir como alimento.

25

En efecto, mientras que las bacterias y los hongos filamentosos son utilizados corrientemente en tecnología alimenticia y para la producción de metabolitos diversos, vitaminas, aminoácidos, antibióticos, enzimas, etc., únicamente las levaduras han sido cultivadas bastante am-

30

1 -pliamente para ser consumidas como alimentos. Esta capaci-
dad de las levaduras para proporcionar importantes cantida-
des de biomasa ha sido confirmada con el descubrimiento
de su propiedad de crecer sobre los alcanos. Se han publi-
5 cado numerosos trabajos, revistas y obras acerca de la pro-
ducción y de las cualidades nutritivas de las levaduras
alimenticias.

10 El microorganismo filamentosos utilizado en el
procedimiento del invento pertenece al género de los Tri-
choderma.

15 Se ha encontrado además que tal microorganismo
filamentosos permitía revalorizar determinados sustratos
proteínicos, especialmente sustratos proteínicos con alto
contenido de proteínas cuya utilización es limitada por el
hecho de que contienen por ejemplo productos tóxicos y/o
productos que les confieren un cierto grado de amargor.

20 El procedimiento según el invento permite por lo
tanto la obtención de proteínas alimenticias que provienen
de la acción de este microorganismo filamentosos sobre sus-
tratos proteínicos. El invento concierne igualmente a los
productos proteínicos así obtenidos, estando constituidos
estos productos por proteínas de sustratos modificados (de
25 purados, desintoxicados o desprovistos de amargor) even-
tualmente en mezcla con proteínas del microorganismo fila-
mentosos o únicamente proteínas del microorganismo filamen-
tosos.

30 El procedimiento para la obtención de proteínas
alimenticias consiste en cultivar, en condiciones que se
describirán seguidamente, un microorganismo filamentosos po-
lífago capaz de metabolizar especialmente los productos

1 - agrícolas y los residuos de las industrias alimenticias,
o de depurar, desintoxicar y suprimir el amargor de los
sustratos proteínicos.

5 El procedimiento según el presente invento con-
siste:

10 1) En cultivar, a una temperatura inferior a
28°C, el hongo Trichoderma Album sobre medios nutritivos
líquidos; siendo mantenido el pH de dichos medios en un va-
lor comprendido entre aproximadamente 3,7 y 4,8, siendo de
aproximadamente 6 a 10 miligramos/litro el contenido de
oxígeno disuelto, realizándose dicho cultivo bajo una agi-
tación eficaz no traumatizante y en condiciones tales que
el esponjamiento o aumento de volumen sea prácticamente nu-
lo.

15 El hongo Trichoderma Album empleado en el proce-
dimiento según el presente invento es un nuevo microorga-
nismo que ha sido depositado en la Collection Nationale de
Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur en Paris
con el número I-032 el 2 de junio de 1977. Este hongo así
20 como su procedimiento de obtención se describirán con ma-
yor detalle en la continuación de la presente memoria des-
criptiva.

25 Los medios nutritivos que son convenientes para
los fines del presente invento, es decir sobre los cuales
se desarrolla dicho Trichoderma Album, comprenden medios
líquidos que contienen nitrógeno proteico, nitrógeno amíni-
co, o nitrógeno mineral (amoniacal o nítrico) que general-
mente son desechados. Proviene en general de productos
agrícolas, de subproductos y desechos de industrias agro-
30 alimenticias. Estos medios pueden estar constituidos igual

1 mente por sustratos proteínicos que se desean revalorizar.

Entre los productos agrícolas convenientes, se citarán, por ejemplo, harinas: de trigo, centeno, maíz, cebada, avena, guisantes, etc.; tubérculos y raíces: de patatas, 5 topinambur, mandioca o yuca, batatas, remolachas, melazas y pulpas de remolacha, zanahorias, colinabos, etc.; pulpas y tegumentos de frutas: de plátanos, piñas, naranjas, manzanas, orujos diversos; productos fibrosos: bagazos, pajas, maderas. Estos medios pueden ser utilizados tal como están 10 o pueden ser previamente higienizados o esterilizados.

Los efluentes y residuos agroalimenticios que pueden ser empleados en el procedimiento según el invento comprenden especialmente excrementos de aves de corral, residuos de cunetas, basuras domésticas, aguas residuales, efluentes 15 de fábricas de conservas, de obtención de proteínas, vinazas de destilería, líquido de maceración de maíz, aguas de difusión de azucareras, los productos que provienen de la fauna marina, especialmente del pescado y crustáceos (por ejemplo el krill). Estos productos son especialmente 20 aguas de prensa (pescado soluble) y los concentrados de proteínas solubles de pescado.

A título de ejemplo de sustratos proteínicos pueden citarse especialmente pulpas de remolacha y concentrados de proteínas solubles de pescado.

25 Igualmente pueden utilizarse mezclas de los productos antedichos en calidad de medios nutritivos.

Cuando se emplean sustratos proteínicos que se desean revalorizar, se cultiva el hongo Trichoderma Album en las condiciones indicadas precedentemente, hasta que 30 sean eliminadas las características indeseables de estos

1 sustratos.

Por ejemplo, cuando se utiliza un concentrado de proteínas solubles de pescado en calidad de medio nutritivo que comprende sustancias amargas, se emplea el procedimiento del invento hasta que el sustrato proteínico quede desprovisto de amargor. El sustrato proteínico obtenido comprende evidentemente micelio de Trichoderma Album, que puede ser eliminado o no por medios clásicos de separación.

10 Los concentrados de proteínas solubles de pescados tienen en general una concentración de aproximadamente 90% de proteínas, que poseen un valor alimenticio manifiesto. No es necesario por lo tanto transformar estas proteínas de pescado en proteínas de Trichoderma Album; esta es la razón de que en el caso de la revalorización de tales

15 sustratos se haga actuar el hongo justamente durante el tiempo necesario para eliminar el amargor; será fácil para un técnico en la materia determinar el tiempo necesario para eliminar este amargor. Los ensayos realizados han mostrado que en general era suficiente dejar desarrollarse el

20 Trichoderma Album sobre tales medios, en las condiciones indicadas precedentemente, durante aproximadamente 3 a 5 horas.

Otro sustrato proteínico que puede ser utilizado según el invento está constituido por pulpa de remolacha.

25 La pulpa de remolacha tiene en general una concentración de 90% de agua; este agua es difícil de eliminar y por prensado según la técnica anterior se obtienen pulpas de remolacha prensadas con una concentración de aproximadamente 80% de agua. Se ha encontrado que haciendo actuar Trichoderma

30 Album sobre pulpas de remolacha puede obtenerse, después de

1 - prensado de pulpas que tienen una concentración de 50%,
agua solamente. Estos productos son útiles para la alimenta-
ción animal, especialmente para la del ganado bovino.

5 En este caso se piensa que el Trichoderma Album
elimina, por la acción hidrolítica de sus enzimas las pecti-
nas contenidas en las pulpas de remolachas y que retienen
el agua.

10 Puede ser ventajoso, cuando se utiliza un sustra-
to proteínico de mala calidad, obtener un producto proteíni-
co que tiene un valor proteico mejorado; esto puede ser rea-
lizado según el invento haciendo desarrollarse a Trichoder-
ma Album sobre el medio que primeramente ha sido depurado,
desintoxicado o desprovisto de su amargor por la acción de
15 Trichoderma Album; es importante entonces equilibrar el me-
dio considerado añadiéndole hidratos de carbono o nitróge-
no. Se obtiene entonces un producto proteínico constituido
por el sustrato modificado y por una cantidad más o menos
importante de proteínas de Trichoderma Album dependiendo
del grado de desarrollo del hongo alcanzado en el momento
20 en que se detiene el procedimiento del invento.

25 Cuando se utiliza en calidad de medios nutritivos
unos medios sin valor alimenticio, se hace crecer el hongo
sobre este medio para agotar al máximo a este último. Se ob-
tienen entonces proteínas de Trichoderma Album. Es importan-
te entonces equilibrar estos medios.

Los grados de materia seca de los medios nutriti-
vos líquidos empleados en el procedimiento según el invento
están condicionados al grado de agotamiento de dichos me-
dios. Si los medios son agotables a fondo, el grado de mate-
ria seca puede ser elevado pero existe un factor limitativo

1 que es el contenido de oxígeno disuelto, debiendo ser mante-
nido éste entre 6 y 10 miligramos/litro de medio. Se deter-
mina el grado de agotamiento de cada medio por un método
ponderal, comparando el peso de micelio obtenido y el grado
5 de materia seca residual.

El contenido de nitrógeno (N atómico) de los me-
dios nutritivos debe ser de aproximadamente 4-5% de materia
seca. En teoría, son necesarios 5 gramos de nitrógeno para
hacer consumir 100 gramos de hidratos de carbono y para pro-
ducir aproximadamente 32 gramos de proteínas; por lo tanto
10 es necesario ajustar el contenido de nitrógeno de los me-
dios a un valor próximo a este valor teórico. Si el conteni-
do de nitrógeno de los medios nutritivos es demasiado eleva-
do, se le añaden hidratos de carbono; por el contrario, si
este contenido es demasiado reducido se añade nitrógeno en
15 una forma apropiada, especialmente en forma de sulfato de
amonio o nitrato de amonio y en cantidad suficiente para te-
ner un contenido de nitrógeno de aproximadamente 4-5 gramos
por cada 100 gramos de materia seca.

20 Los medios nutritivos líquidos pueden obtenerse a
partir de productos agrícolas, de subproductos y de resi-
duos de industrias agroalimenticias, por ejemplo por el pro-
cedimiento representado en la figura 1, que ilustra la ob-
tención de proteínas de Trichoderma Album. Según este proce-
25 dimiento los productos, subproductos o residuos son sometidos
a una o varias trituraciones, a una o varias homogenei-
zaciones y separaciones diferenciales. Las fracciones sólidas
resultantes son tratadas seguidamente según procedimien-
tos clásicos conocidos con vistas a la recuperación de sus-
tancias húmicas utilizables como abonos. Las fracciones lí-

1 -quidas recogidas son reunidas, concentradas, eventualmente
higienizadas o esterilizadas, y su contenido de nitrógeno
es ajustado a un valor de aproximadamente 4 a 5% de materia
seca, antes de ser sometidas al procedimiento según el pre-
5 sente invento. El micelio recuperado es seguidamente secado
y acondicionado para proporcionar una harina de proteínas
que contiene en general 50 a 65% de proteínas; los efluen-
tes líquidos resultantes son utilizados como abonos o como
aportaciones de enzimas.

10 El pH de los medios de cultivo debe estar compren-
dido entre 3,7 y 4,8 y ser mantenido en un valor comprendi-
do en esta gama durante toda la operación de cultivo. En
efecto, ensayos preliminares han mostrado que el agotamien-
to de los medios raramente sobrepasa de 50% en el caso de
15 la rápida caída del oxígeno disuelto y de variaciones consi-
derables del pH. Por lo tanto es indispensable mantener el
pH dentro de la gama antedicha con el fin de obtener una op-
timización de los cultivos. El pH es mantenido automática-
mente por dosificadores que permiten añadir al medio nutri-
20 tivo una base o un ácido, dependiendo del valor del pH; pue-
de utilizarse por ejemplo sosa, ácido clorhídrico, ácido
sulfúrico o cualquier otro ácido o base apropiado. Igualmen-
te, es necesario que el contenido de oxígeno disuelto esté
comprendido entre aproximadamente 6 y 10 miligramos/litro,
25 preferentemente 8 miligramos/litro.

Los cultivos de Trichoderma Album son realizados
a una temperatura inferior a 28°C, preferentemente entre 24
y 28°C. El Trichoderma Album ya no se desarrolla más a una
temperatura superior a 28°C. Por el contrario, este microor-
ganismo trabaja a una temperatura inferior a 24°C pero con

1 una velocidad muy lenta. Por lo tanto es ventajoso trabajar a una temperatura comprendida entre 24 y 28°C.

La operación de cultivo debe realizarse con una agitación eficaz no traumatizante, es decir con una agitación que no inhiba el crecimiento del microorganismo y bajo la cual éste no experimente lisis.

Los cultivos de Trichoderma Album pueden ser realizados sobre agitadores o en fermentadores; es importante respetar las condiciones operatorias antes definidas. Hay que hacer observar no obstante que el crecimiento de los microorganismos en cultivo sumergidos, es decir en fermentadores, es generalmente mucho más rápido y que el agotamiento de los medios es más completo en el caso en que se controlen y dominen los problemas de agitación, de aireación y de esponjamiento o aumento de volumen.

Los tipos de fermentadores utilizados para cultivar las bacterias y las levaduras no son eficaces para desarrollar y reproducir hongos filamentosos. Los fenómenos más difíciles de dominar en el empleo del procedimiento según el invento son: la agitación, la aireación y el esponjamiento o aumento de volumen.

Mientras que las levaduras y las bacterias toleran agitaciones violentas, el crecimiento de Trichoderma Album es fuertemente inhibido más allá de una agitación de 150 vueltas/minuto y el microorganismos experimenta lisis con 400 vueltas/minuto. Este fenómeno es un factor limitativo importante, toda vez que no es posible mantener el grado de oxígeno disuelto en 4 miligramos/litro agitando a menos de 100 vueltas/minuto.

1 tro de medio/minuto) no puede mantener por sí sola durante
más de 3 a 6 horas el grado de oxígeno disuelto en un valor
de 5 miligramos/litro. Además, con importantes volúmenes de
aire es imposible de dominar el aumento de volumen o espon-
5 jamiento.

En el curso de las fermentaciones, las espumas
plantean siempre problemas. En el presente caso, las sustan-
cias antiespumantes deben ser alimenticias; por consiguient-
te, deben prohibirse los antiespumantes a base de siliconas.

10 Las mezclas de aceites vegetales y sales de áci-
dos grasos no han dado más que resultados muy medianos.

Por lo tanto es necesario modular la agitación,
la aireación y las cantidades de agentes antiespumantes con
el fin de obtener un satisfactorio compromiso.

15 Con el fin de obtener este satisfactorio compromi-
so, se ha puesto a punto un nuevo dispositivo de fermenta-
ción que constituye otro objeto del presente invento.

El dispositivo de fermentación según el presente
invento comprende, a título de elementos esenciales: un fer-
20 mentador, medios de oxigenación y medios antiespumantes.
Comprende también medios de regulación de la temperatura,
de pH y del contenido de oxígeno disuelto.

El fermentador debe comprender un lento sistema
de mezclado del micelio y del medio de cultivo; este siste-
25 ma de mezclado puede estar constituido por ejemplo por un
conjunto de placas perforadas sobre las cuales se encuentra
el micelio, siendo dichas placas paralelas y estando uni-
das entre ellas por un sistema que permite desplazarlas den-
tro del medio de cultivo.

30 Los medios de oxigenación deben ser apropiados pa-

1 ra oxigenar el medio de cultivo; pueden estar constituidos
ventajosamente por un centrifugador de cámaras que permita
una oxigenación fuera del fermentador. Otros dispositivos
de oxigenación fuera del fermentador, tales como bombas cen-
5 trífugas, dispositivos venturi, mezcladores estáticos y chi-
meneas de oxigenación pueden manifestarse más apropiados en
el caso de un cambio de los grados de recirculación reteni-
dos, que dependen de los sustratos y de sus concentraciones.

Los medios antiespumantes deben permitir la resor-
10 ción de la espuma formada, por ejemplo en el centrifugador
de cámaras. Estos medios deben permitir la formación de una
columna líquida en voladizo con respecto a los medios de
oxigenación, completados eventualmente por medios clásicos
químicos y mecánicos.

15 El dispositivo según el invento puede ser utiliza-
do para el cultivo de bacterias, levaduras y hongos filamen-
tosos. En el caso del cultivo de hongos filamentosos, es
necesario prever medios de desobstrucción; éstos pueden es-
tar constituidos por un vaso de expansión o por medios neu-
20 máticos, o pueden realizarse de modo continuo por un filtro
exterior por ejemplo de cinta o banda, o bajo vacío. Los mi-
croorganismos separados son reinyectados en este caso en el
fermentador por medio de una bomba volumétrica o de una cin-
ta transportadora. Aunque estos medios no sean indispensa-
25 bles en el caso de cultivos de levaduras o de bacterias,
con frecuencia es ventajoso intercalar un vaso de expansión
entre el fermentador y los medios de oxigenación.

Un modo de realización del dispositivo de fermen-
tación según el invento apropiado para el cultivo de hongos
filamentosos va a ser descrito ahora detalladamente hacien-

1 do referencia a la figura 2, que es una vista esquemática
de este dispositivo, y a la figura 3, que es un modo de rea-
lización particular de una variante.

5 El fermentador del dispositivo según el invento
está constituido por una cuba (1), generalmente cilíndrica,
cuyo fondo tiene preferentemente una forma troncocónica y
está provisto de un conducto de trasiego (2). Esta cuba (1)
comprende medios de aireación (3) que permiten realizar la
10 aireación del medio de cultivo al comienzo de la operación
de cultivo de hongos filamentosos. Comprende también un con-
junto de placas perforadas (4) unidas entre sí por el sopor-
te (5) y por columnas (6). El soporte (5) está unido con un
sistema excéntrico (7) movido por un motor (21) que permite
15 mover el conjunto de las placas imprimiéndole un movimiento
de abajo a arriba. El sistema excéntrico y el conjunto de
las placas perforadas constituyen una especie de agitador
que permite hacer subir al micelio por encima del nivel del
líquido. Es evidente que este sistema de agitación puede
ser reemplazado por cualquier sistema análogo. Por ejemplo,
20 puede utilizarse el sistema de agitación representado en la
figura 3. Este sistema de agitación, que constituye una va-
riante según el invento, está constituido por un conjunto
de placas (4) unido con un eje horizontal (5) animado de un
movimiento de rotación, por ejemplo en el sentido indicado
25 por la flecha.

La cuba de fermentación (1) comprende también una
conducción (8) para evacuación de los gases (aire y gas car-
bónico). El fermentador está unido con un vaso de expansión
(9) por intermedio de una conducción de diámetro grande. La
30 conducción (10) está provista en su extremo, en unión con

1 el fermentador, con un tamiz de retención (11) y con una
válvula de cierre (12). El vaso de expansión (9) comprende
un tamiz de retención (13). Está unido con el centrifugador
de cámaras (14) por intermedio de una conducción (15), que
5 comprende eventualmente un cuello de cisne (20) y en cuyo
curso está situada una bomba de circulación (16) y una admi-
sión de aire (17). El centrifugador de cámaras (14) está
unido con la cuba (1) por intermedio de la conducción (18),
que llega a la parte superior de la cuba (1).

10 Por intermedio de la canalización (17) puede in-
yectarse aire si es necesario.

La conducción (18) debe ser obligatoriamente de
diámetro superior en la canalización de entrada en el cen-
trifugador y debe estar en voladizo con relación al centri-
15 fugador para permitir la formación de una columna de líqui-
do con el fin de evitar la formación de espuma; de esta ma-
nera, la espuma formada se resorbe en la parte ascendente
de la conducción (18).

En la puesta en práctica del procedimiento según
20 el invento, en el dispositivo de fermentación que se ha de-
finido anteriormente el mezclado del medio de cultivo y del
microorganismo Trichoderma Album se realiza lentamente a ra-
zón de aproximadamente 15 a 30 movimientos por minuto, gra-
cias al sistema de placas perforadas (4), que hace subir al
25 micelio por encima del nivel del líquido.

Durante las 3 a 4 primeras horas de operación de
cultivo, la aireación se realiza por el fondo de la cuba
por intermedio de los medios de aireación (3); la aireación
se realiza así al comienzo para evitar el paso de los fila-
mentos y el crecimiento en el vaso de expansión; luego,

1 cuando el micelio está en su fase de crecimiento exponen-
cial, la válvula (2) es abierta; la bomba de circulación
(16) y el centrifugador de cámaras (14), en el que se reali-
za la oxigenación, son puestos en marcha; la expulsión del
5 fluido se efectúa a mayor altura en la canalización de diá-
metro mayor (18), lo cual permite la disipación de la espu-
ma en la columna de líquido reconstituida. El medio reoxige-
nado se vierte en la cuba del fermentador (1) a aproximada-
mente 30 centímetros por encima del nivel del líquido; la
10 placa superior del mezclador arrastra la pequeña capa de es-
puma en el medio. Los dos tamices (11) y (13) permiten fil-
trar el medio nutritivo y contener al micelio dentro del
fermentador. El caudal es regulado en función de las necesi-
dades de oxígeno. Gracias a este dispositivo, es fácil de
15 mantener en el medio un grado de oxígeno disuelto convenien-
te (de 6 a 10 miligramos/litro) y asegurar un crecimiento
óptimo del microorganismo y un agotamiento máximo de los me-
dios de cultivo.

20 El dispositivo según el invento permite realizar
de modo continuo el cultivo; en este caso, los tamices son
entreabiertos, el micelio recogido en el centrifugador es
evacuado por lavados y trasiegos; la parte eliminada del lí-
quido es reemplazada por medio nutritivo de nueva aporta-
ción.

25 El dispositivo según el invento, que permite rea-
lizar una eficaz oxigenación de los medios de cultivo y do-
minar la formación de espuma o esponjamiento, es perfectamen-
te apropiado para los cultivos de bacterias y de levaduras.
Este dispositivo de fermentación según el invento es por lo
30 tanto un dispositivo de fermentación de microorganismos en

1 general (bacterias, levaduras, hongos).

5 En el caso de cultivos de bacterias y de levaduras, pasan cantidades variables de microorganismos al centrifugador; al comienzo del cultivo, éstas son inyectadas de nuevo en el fermentador por lavados y trasiegos, y, seguidamente, durante cultivos continuos, son recogidas; la parte del jugo que ha sido eliminada es reemplazada por un medio de cultivo de nueva aportación.

10 Tal como se ha indicado precedentemente, las fermentaciones según el procedimiento del invento para la obtención de proteínas pueden realizarse de un modo continuo o de un modo discontinuo.

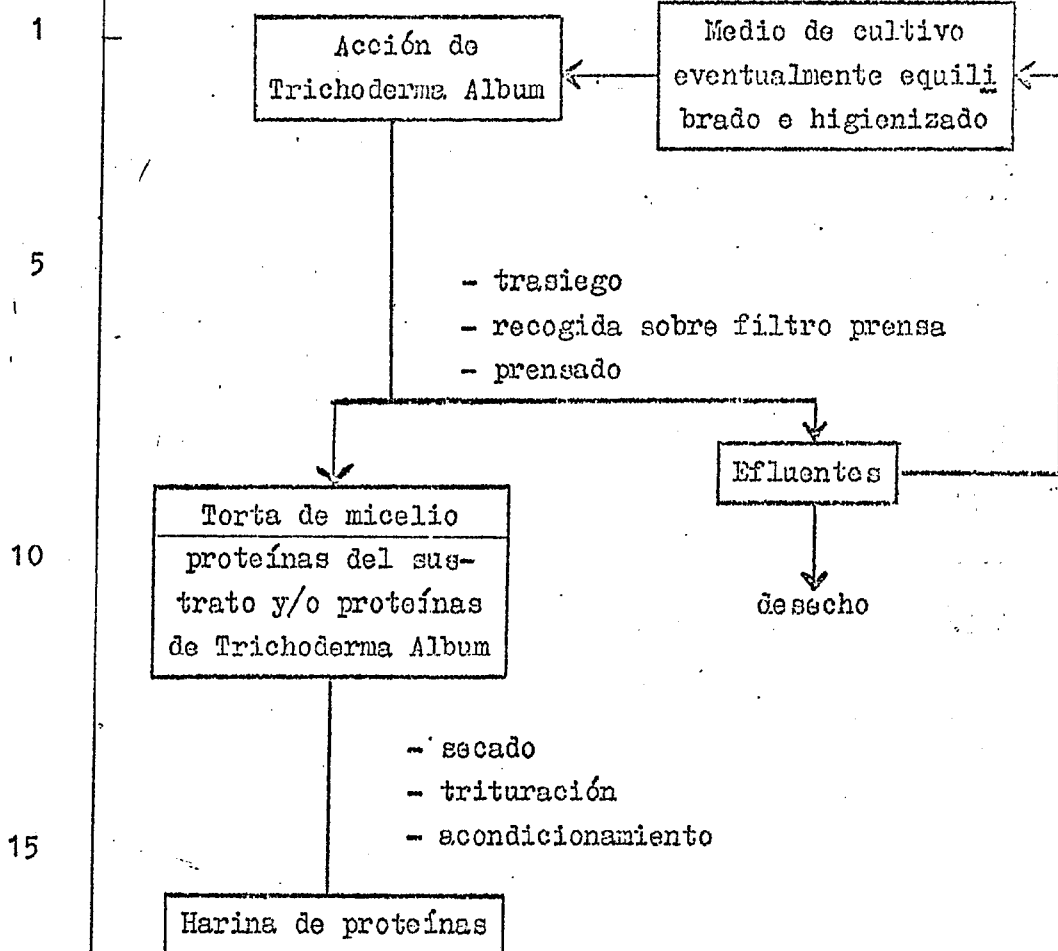
15 Cuando las fermentaciones se realizan de un modo discontinuo, se retira aproximadamente los 9/10 del cultivo cada 15 a 20 horas aproximadamente y se reemplazan estos 9/10 de cultivo por un medio de nueva aportación ajustado e higienizado. En numerosos casos, es posible la recirculación de los efluentes.

20 El producto proteínico obtenido según el procedimiento para la obtención de proteínas puede ser recogido ventajosamente según el sistema seguidamente indicado:

25

30

31058



20 Después de haber trasegado, la cosecha es recuperada por filtración, por ejemplo sobre un filtro prensa o cualquier otro dispositivo apropiado de filtración. Después de filtración, el cultivo es prensado para formar una torta de micelio que contiene 30 a 50% en peso de materia seca. Esta torta de micelio es seguidamente secada, eventualmente

25 triturada y acondicionada con vistas a su conservación o a su transporte.

El secado del producto proteínico por liofilización, atomización, fluidificación o sobre un rodillo secador (del tipo "Hatmaker") secador de banda o secador neumático, es muy rápido. Estos procedimientos de secado permi-

1 -ten obtener y llegar a un alimento con una calidad excepcio-
nal y que no dejan ninguna célula susceptible de vivir.

5 Por el contrario, los procedimientos estáticos de
secado alteran el valor nutritivo del producto. En efecto,
la plasmólisis libera las estructuras amínicas y glucídicas
simples que reaccionan por reacción de "Maillard". Los pro-
cedimientos estáticos de secado han de ser prohibidos por
lo tanto.

10 A la salida del filtro prensa, el producto proteí-
nico, que contiene especialmente el micelio de Trichoderma
Album, posee una estructura filamentosa bien individualiza-
da. Al secar, esta estructura se hace muy desmenuzable y se
deshace espontáneamente.

15 Cuando el producto proteínico está constituido
únicamente por proteínas de Trichoderma Album, el micelio
seco y triturado se presenta en forma de un polvo blanco,
con una densidad que oscila entre 0,6 y 0,9. Este polvo, no
esponjable, es untuoso, muy fácilmente humectable, y carece
de olor y sabor. Ciertos medios de cultivo pueden conferir-
20 le no obstante sabores específicos.

 En microscopio, no se puede percibir ninguna es-
tructura de micelio. Se observan solamente pedazos o restos
de formas diversas cuyas dimensiones varían entre 5 y 50 μ .

25 Las proteínas de Trichoderma Album obtenidas se-
gún el procedimiento del presente invento se presentan en
la forma de polvo que contiene 50 a 65% de proteínas.

 Las composiciones centesimales y de aminoácidos
del micelio de Trichoderma Album, obtenido según el procedi-
miento del invento y secado, se dan en las tablas I y II.

 En la tabla II se han indicado las composiciones

1 de otros materiales proteínicos obtenidos según los procedi-
mientos clásicos.

Los productos proteínicos constituidos por una
mezcla de proteínas de sustrato y de micelio tienen un con-
5 tenido de proteínas que varía dependiendo del sustrato de
partida y de la cantidad de micelio.

TABLA I

COMPOSICION CENTESIMAL DEL MICELIO

SECO DE TRICHODERMA ALBUM

(% en peso)

Proteínas (N x 6,25)	55 a 63
Nitrógeno no proteínico	3 a 5
Grasas	6 a 12
Azúcares insolubles	8 a 10
Azúcares solubles	7 a 10
Acidos nucleicos	4 a 6
Cenizas	6 a 9
Agua	3 a 5

25

30

31058

TABLA II

COMPOSICION DEL TRICHODERMA ALBUM

comparado con otros materiales proteínicos, en porcentaje para 16 g de N

	Caseína láctica	Torta de soja	Torta de sésamo	Harina de altramuz "New Land"	Hongos de París	Trichoderma Album secado sobre "Hatmaker"	Trichoderma Album liofilizado	Trichoderma Album plasmoliza- do fracción soluble en agua	Trichoderma Album plasmoliza- do fracción insoluble en agua	Trichoderma Album aminoácidos libres
LIS	8,2	6,4	2,8	5,3	6,9	8,3	8,3	10,4	5,9	7,1
HIS	3,7	3,2	3,1	2,4	1,7	2,2	2,6	2,4	2,3	0,9
ARG	4,4	7,7	14,2	12,0	4,9	5,6	5,8	6,4	5,6	4,2
ASP	6,7	11,4	8,1	10,4	9,5	10,0	9,4	10,2	10,8	10,9
TRE	4,1	4,0	3,9	3,3	5,0	5,7	4,8	5,4	5,9	2,5
SER	4,9	5,1	4,6	3,9	4,7	5,2	5,3	5,7	5,4	8,1
GLU	20,3	18,5	19,7	24,1	24,7	13,6	16,0	12,0	13,8	11,5
PRO	10,6	5,3	3,5	4,5	6,1	5,4	5,5	5,2	5,1	3,2
GLI	1,6	4,0	4,4	3,3	4,2	5,2	4,2	6,0	5,2	2,2
ALA	2,6	4,2	4,4	3,2	7,9	6,5	6,3	7,1	6,3	8,7
CIS-MET	3,1	3,9	6,8	2,0	2,0	3,2	3,9	2,8	4,0	2,5
VAL	5,9	4,8	4,5	4,0	5,7	5,9	5,8	6,0	6,3	6,8
ILE	5,1	5,2	4,1	4,8	4,6	5,6	6,1	4,7	5,4	6,5
LEU	8,6	7,9	7,4	8,2	6,4	8,4	8,1	8,1	9,0	12,3
TIR	5,5	4,2	3,8	4,1	1,8	4,1	3,4	3,4	3,7	7,3
FE	4,8	5,7	4,7	4,3	3,8	4,9	4,3	4,1	5,0	7,1
MAT. PROT. EN % M.S.	91,4	52,6	53,9	34,8	40,5	56,7	63	75,0	45,0	4

1 Tal como se ha indicado precedentemente, la especie Trichoderma Album empleada en el procedimiento según el invento es una nueva especie de hongos filamentosos que ha sido seleccionada en el Institut National de Recherche Agronomique. El procedimiento de selección de la cepa que se describirá seguidamente, forma parte igualmente del marco del invento. Puede ser empleado con bacterias, estreptomices y otros hongos, especialmente los ficomicetos (Rhizopus); los basidiomicetos (Ustilago, Corticium, Fomes, Taphrina, Sclerotinia, Rhabdocline, Phaciidiella, Epichloe, Nectria, Ophiobolus, Endothia); los adelomicetos (Phoma, Ascochyta, Septoria, Colletotrichum, Gloeosporium, Monilia, Sterigmatocystis, Gliocladium, Geotrichum, Acrostalagmus, Trichoderma, Botrytis, Cephalosporium, Verticillium, Trichothecium, Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Pullularia, Torula, Thielaviopsis, Alternaria, Cercospora, Sporodesmium, Helminthosporium, Epicoccum, Graphium).

Primeramente se van a dar algunas indicaciones acerca de la taxonomía y la biología de los hongos.

Los hongos pertenecen al sector de los vegetales criptógamos, eucariotos, talofitos, no clorofílicos.

Más de 100.000 especies de hongos son conocidas; se caracterizan por una pluralidad muy grande de formas que van desde una célula individualizada (levaduras) hasta la organización compleja de los carpóforos (setas). Existen considerables diferencias de tamaño, aspecto, estructura, actividades metabólicas, modo de vida, etc.

Se distinguen entre hongos saprofitos, hongos patógenos, hongos simbióticos, hongos micorrizicos.

En los microorganismos se distingue citológica-

1 mente un núcleo, mitocondrios, vacuolos, glóbulos lipídicos, glicógeno, etc. Las paredes celulares están constituidas por celulosa, pectinas, calosa, quitina. El protoplasma fúngico está dotado de movilidad, y se desplaza desde
5 la parte central, que se vacuoliza, hacia la periferia.

El talo edifica elementos reproductores (las esporas), con génesis a veces muy simples: fragmentación (artrosporas) o brote (en las levaduras).

10 Las esporas pueden ser también elaboradas por órganos de fructificación muy diferentes tales como el sombrero de los agaricos o el peritocio de los pirenomicetos.

Las esporas, cuya formación implica la previa fusión de dos núcleos compatibles, seguida por una división reductora, aseguran la reproducción sexuada o perfecta.

15 La clasificación de los hongos está basada en la naturaleza del talo vegetativo, que puede ser:

- 1) plasmodial en los mixomicetos
- 2) celular o filamentosa en los eumicetos.

En este segundo grupo, se distingue:

20 a) Los hongos inferiores (sifomicetos o ficomicetos) en los cuales no hay más que una célula filamentosa gigante multinucleada. Los filamentos se alargan y se ramifican sin compartimentarse y en general sin anastomizarse. La masa citoplásmica y los núcleos se desplazan libremente
25 en el interior de las paredes tubulares.

Los ficomicetos se reproducen por huevos enquistados (oosporas, zigosporas) formados sobre el micelio como consecuencia de una conjugación entre gametos libres o entre órganos sexuales filamentosos más o menos diferenciados.

30 b) Los hongos superiores o septomicetos (ascomice

1 tos, hemiascomicetos, basidiomicetos, hongos imperfectos).

5 Estos hongos poseen un micelio constituido por filamentos microscópicos (las hifas). Las hifas ramificadas, yuxtapuestas, anastomizadas, pero jamás organizadas en tejidos, son divididas en segmentos uninucleados y plurinucleados, por tabiques transversales. Estos diafragmas, frecuentemente cerrados de manera incompleta, permiten la circulación del protoplasma y de los núcleos de una célula a otra. Las anastomosis son frecuentes entre hifas de una especie o de especies afines, lo cual favorece la heterocariosis. La heterocariosis consiste en la reunión en un mismo micelio de núcleos portadores de potenciales genéticos diferentes, ya sea porque resultan de mutaciones, ya sea porque provienen de organismos diferentes.

15 Los hongos superiores producen generalmente sus esporas sexuadas en o sobre órganos de fructificación localizados. La diferenciación de sus elementos sexuales es generalmente pequeña y la fecundación tiende a manifestarse simplemente por la conjugación de núcleos apareados en filamentos no especializados; conduce a la formación de ascosporas contenidas en ascas o basidiosporas producidas en basidios. En los hongos imperfectos, la reproducción es asexual, a falta sin duda de compañero compatible; la multiplicación se efectúa por conidios.

25 El mundo de los hongos es menos amplio y vasto que el de las plantas. No obstante, los caracteres biológicos de estos microorganismos les confieren una sorprendente plasticidad y se ha observado que muy numerosos individuos esconden en sí los potenciales genéticos de una nueva raza o especie. En estos individuos, se ha encontrado que

30

31058

1 es posible suprimir los inconvenientes y extraer caracteres interesantes, aprovechables en numerosos sectores, especialmente para las producciones de biomazas alimenticias.

5 El procedimiento de selección de los caracteres interesantes de un microorganismo, según el invento, consiste, en su aspecto más general, en cultivar una cepa salvaje sobre medios de cultivo selectivos, en incubar los cultivos en condiciones específicas de temperatura y de iluminación, en proceder a microaislamientos y mezclar las cepas mejoradas en presencia, o no, de acridina naranja, con
10 nuevo aislamiento de las hifas blancas.

Los medios de cultivo selectivos empleados en el procedimiento según el invento se escogen en función de criterios molestos de la cepa salvaje que se quieren hacer
15 desaparecer.

En su aspecto más detallado, el procedimiento según el presente invento consiste:

1) en inocular los medios selectivos escogidos con una cepa salvaje;

20 2) en incubar cada cultivo en las condiciones siguientes:

a) a 27°C durante un día,

b) a 37°C durante dos días en la oscuridad y luego durante dos días a la luz,

25 c) a 27°C durante dos días,

3) en exponer seguidamente a los rayos ultravioletas (250 nm) a las cepas blancas y vigorosas que provienen de cada cultivo efectuado sobre los medios selectivos, durante dos horas a 4°C;

30 4) en transplantar las cepas sobre el medio

1 "STARON";

5) en incubar los cultivos resultantes durante dos días a 37°C y luego durante dos días más a 27°C, tras haber eliminado, antes de la disminución de temperatura de 37 a 27°C, las cepas que se desarrollan;

6) en cultivar dichas cepas sobre el medio líquido y agitado de "STARON" durante dos días a 27°C.

7) en proceder a retiradas estériles;

8) en mezclar en presencia de acridina naranja las cepas de mayor rendimiento, ricas en proteínas, y pobres en glicosamina y antibióticos;

9) en incubar las cepas resultantes sobre el medio "STARON" durante dos días a 27°C;

10) en proceder a microaislamientos; y

11) en incubar durante dos días las cepas resultantes a 27°C;

las cepas así obtenidas son sometidas de nuevo al ciclo antes definido, etapas 1) a 11), durante un número de ciclos suficiente para obtener una cepa que posea las características deseadas.

Igualmente es posible someter a las cepas a un ciclo parcial.

En efecto, los criterios molestos que se quieren eliminar desaparecen en general unos tras de otros; por lo tanto no es necesario mantener en el ciclo de selección la etapa que pretende eliminar dicho criterio, y está al alcance de un técnico en la materia determinar, gracias a los controles efectuados en el curso de cada ciclo, las etapas que han de mantenerse y las que han de suprimirse.

En el procedimiento según el invento, puesto en

1 -práctica para formar el Trichoderma Album, se utiliza un lote de 11 medios de cultivo; 8 medios están constituidos por una solución mineral de pH = 6,8 que contiene los constituyentes seguidamente mencionados:

5 $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1 \text{ g}; \text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O} = 0,5 \text{ g};$
 $\text{KCl} = 0,2 \text{ g}; \text{CaCl}_2 = 0,2 \text{ g};$
 $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O} = 0,03 \text{ g}; \text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O} = 0,01 \text{ g};$
 $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O} = 2 \text{ mg};$
 10 agua destilada: cantidad suficiente para 100 ml;
 gelosa 20 g,

a la que se han añadido los compuestos siguientes:

Medio 1): .

30 g de glicerina + 2 g de urea .

Medio 2):

20 g de sacarosa + 3 g de alantoína

Medio 3):

20 g de almidón + 5 g de sulfato de amonio

Medio 4):

20 g de glucosa + 7 g de tirosina

20 Medio 5):

5 g de pectina de manzanas + 7 g de ácido antra-
nílico

Medio 6):

20 g de almidón + 5 g de nitrato de sodio

25 Medio 7):

10 g de manita + 8 g de caseína láctica

Medio 8):

20 g de ácido glucónico + 10 g de gelatina.

El medio 9 es el medio "STARON" que contiene glu-
cosa = 20 g; peptona = 6 g; extracto de levadura = 1 g; lí-

30

1 quido de maceración de maíz = 4 g; NaCl = 0,5 g; MgSO₄, 7
H₂O = 0,5 g; KH₂PO₄ = 1 g; FeSO₄, 7H₂O = 10 mg; agua desti-
lada, cantidad suficiente para 1 litro; gelosa = 20 g para
medios sólidos.

5 El medio 10 está constituido por patatas nutriti-
vas y el medio 11 es suero láctico con 40 g/l.

Tal como se ha indicado precedentemente, pueden
someterse los cultivos a ciclos parciales; por ejemplo, en
el caso de Trichoderma Viride, puede someterse a cada cul-
10 tivo efectuado sobre cada uno de los once medios a las eta-
pas 1 a 4, puede procederse seguidamente a una incubación
durante dos días a 27°C, y luego a microaislamientos para
seleccionar las cepas blancas y vigorosas, y seguidamente
a una incubación, todavía durante dos días más a 27°C, de
15 estas cepas blancas y vigorosas; las cepas así obtenidas
son seguidamente inoculadas en los once medios selectivos
y se vuelven a comenzar los ciclos, parciales o completos,
comprendiendo los ciclos completos las etapas 1 a 11).

Los ciclos parciales o completos del procedimien-
20 to según el presente invento son representados esquemática-
mente en la figura 4.

Los métodos de control efectuados a lo largo de
los ciclos representados en la figura 4 son especialmente:

- la valoración de la glicosamina después de hi-
25 drólisis del micelio en HCl 6 N y resolución en un auto-ana-
lizador conocido con la denominación comercial "Technicon
TSM₁"

- la valoración microbiológica de los péptidos
antibióticos, de la tricotodermina y de la gliotoxina después
30 de extracción con n-butanol,

1 - la medición de la intensidad de la plasmólisis (secado a 60°C, trituración y determinación de la fracción soluble en agua a pH = 8),

5 - el pesado de la materia seca producida y la de terminación de su grado o concentración de proteínas mediante microanálisis KJELDAHL,

- la determinación ponderal de la cantidad de materia seca consumida en el medio.

10 Las incubaciones efectuadas a 27°C según el procedimiento del invento se realizan siempre a la luz natural. Cuando se precisa que las incubaciones se realizan a 37°C a la luz, se trata de una luz blanca con una intensidad de 2 a 300 wátios por metro cuadrado.

15 Los microaislamientos efectuados en el curso del procedimiento de acuerdo con el presente invento consisten en separar las hifas con ayuda de un microscopio óptico.

20 El número de ciclos a efectuar depende de la cepa original y de las características deseadas. Los métodos de control permiten determinar si se han alcanzado estas características.

Según el procedimiento de selección del presente invento, pueden obtenerse cepas nuevas que poseen caracteres interesantes, aprovechables en numerosos sectores, especialmente para la producción de biomasa alimenticias.

25 El procedimiento ha sido aplicado con éxito especialmente a Trichoderma Viride, Fusarium roseum, Bauveria Tenella, Trichoderma polysporum, Aspergillus oryzae y se ilustra por los ejemplos V y VI siguientes.

30 Otros ejemplos de aplicación del procedimiento de selección han sido mencionados con anterioridad.

1 El invento va a ser descrito ahora con mayor detalle en los ejemplos ilustrativos no limitativos que se exponen seguidamente:

EJEMPLO 1

5 Cultivo en fermentador

En este ejemplo, se han tratado, según el procedimiento del invento, medios líquidos de cultivo que contienen 60 ó 90% de materia seca (gramos por volumen) y que provienen respectivamente de suero láctico, de jugo de alfalfa, de harina de trigo, de efluentes de factorías de obtención de proteínas, de jugos de patata, de líquidos de maceración de maíz (aguas de maceración en las factorías de obtención de almidón de granos de maíz) y melazas de remolacha.

15 Se ha utilizado el dispositivo de fermentación según el presente invento. En la cuba (1) se han introducido 100 litros de medio y 10 litros de Trichoderma Album obtenido por cultivo sobre agitador. Durante las tres a cinco primeras horas de cultivo, éste ha sido aireado mediante los medios de aireación (3) que estaban constituidos en el caso presente por una tubería circular provista de agujeros y por un dispositivo de aportación de aire. La cantidad de aire inyectado era tal que el contenido de O₂ disuelto estuviera comprendido entre 6 y 10 mg/l. Se ha mantenido la temperatura del medio de cultivo entre 24 y 28°C y el pH en un valor comprendido entre 3,7 y 4,8 de un ácido o de una base.

20
25
30 Cuando el micelio ha estado en su fase exponencial, se ha procedido de acuerdo con el modo de trabajo descrito anteriormente, es decir se ha abierto la válvula

1 (10) y se ha puesto en funcionamiento la bomba de circula-
ción (15) y el centrifugador (12). El caudal de oxígeno en
el centrifugador ha sido regulado de manera que se mantenga
5 el contenido de O_2 disuelto en un valor comprendido entre
6 y 10 mg/l. Después de 15 a 20 horas de cultivo, se
ha recogido el micelio por trasiego y se le ha filtrado so-
bre un filtro prensa; se han obtenido 7 a 9 kg de torta de
micelio con 50% de materia seca. Esta torta ha sido secada
seguidamente sobre rodillos del tipo "Hatmaker" o por lio-
10 filización y se ha obtenido una harina de materiales fila-
mentosos con 57 a 65% de proteínas. La composición centesi-
mal de los productos obtenidos con cada medio, así como su
composición en aminoácidos, eran sensiblemente las mismas
que se indican en las tablas I y II. Las cantidades de ma-
15 terias secas producidas y que quedan al cabo de 10 y 20 ho-
ras, se consignan en la tabla IV.

EJEMPLO II

Cultivo sobre agitador

20 Se ha cultivado Trichoderma Album sobre agitador
(150 revoluciones por minuto) en matraces Erlenmeyer de
500 ml que contienen 100 ml de medio. Los medios comprendían,
por litro, 40 a 70 g de materia seca ajustada a 3% de N;
el pH de partida era de 4,5. La duración del cultivo era
de 20 horas hasta 40 horas a 27°C. La recogida del micelio
25 se ha efectuado sobre filtro prensa y el secado se ha rea-
lizado por liofilización.

Los promedios de los resultados obtenidos están
dados en la tabla III siguiente:

TABLA III

Medio pH al comien- zo = 4,5 O ₂ disuelto al comienzo = 8 mg/l	pH.		O ₂ disuel- to mg/l.		MS produ- cida g/l		MS restan- te g/l	
	20 h	40 h	20 h	40 h	20 h	40 h	20 h	40 h
40% MS	6,5	7	4	4	6	9	30	27
70% MS	6,5	6,2	5,0	2,0	12	18	49	41

En las condiciones de trabajo antedichas, no es posible hacer óptimos los cultivos; no obstante, son excelentes los rendimientos de micelio, pero el agotamiento de los medios raramente rebasa de 50% debido a la caída rápida del oxígeno disuelto y las considerables variaciones del pH.

Otros ensayos realizados según el modo de trabajo antedicho, pero manteniendo el pH en un valor entre 3,7 y 4,8 y el contenido de oxígeno disuelto entre 6 y 10 mg/l, han mostrado que en estas condiciones de pH y de O₂ disuelto podía lograrse la optimización.

EJEMPLO III

Comparación entre el cultivo en fermentador según el invento con el cultivo en un fermentador tradicional

En este ejemplo, se ha realizado un cultivo de Trichoderma Album sobre los medios definidos en el ejemplo I en las condiciones de trabajo descritas en el ejemplo II; los medios de cultivo contenían 60 y 90% de materia seca;

1 el pH ha sido mantenido en 4,5 y la temperatura en 27°C.
 Se han medido las cantidades de materia seca producidas y
 restantes al cabo de 10 horas a 20 horas de cultivo. Los
 resultados obtenidos están consignados en la tabla IV si-
 5 guiente:

TABLA IV

Medios higienizados 4% de N/M.S. pH mantenido a 4,5 temperatura 27°C		O ₂ disuel to mg/l		M.S. pro ducida g/l		M.S. res tante g/l		
		10 h	20 h	10 h	20 h	10 h	20 h	
15	fermentación en fermentador tradicional (suero láctico, harina de trigo)	60°/oo MS	5	3	15	19	33	20
	90°/oo MS	4	1,5	21	25	50	30	
20	fermentación realizada con el dispositivo según el inven to (7 sustra tos del ejem plo I)	60°/oo MS	8	7	27	35	15	3
		90°/oo MS	6	6	30	45	38	10

Los resultados de la tabla IV muestran que todos
 los cultivos realizados con el dispositivo según el inven-
 to han sido controlados y dominados; los resultados obteni-
 25 dos son muy buenos. Por el contrario, los cultivos efectua
 dos de manera tradicional, es decir en un fermentador adap
 tado para obtener bacterias, levaduras o producir antibió-
 ticos, enzimas, etc., no han podido ser realizados válida-
 mente más que sobre dos sustratos, a saber, el suero lácti
 30 co y harina de trigo.

1 Como conclusión, el dispositivo según el invento permite obtener una mayor producción de biomasa y un agotamiento mayor de los medios.

EJEMPLO IV

5 Valor nutritivo del micelio Trichoderma Album

El valor nutritivo del micelio de Trichoderma Album obtenido según el ejemplo I ha sido comparado con el valor nutritivo de la caseína láctica, de la torta de soja, de la torta de sésamo, de los hongos de París y de los granos de altramuza crudo.

10 Los valores CEP (ganancia de peso/proteínas ingeridas) han sido determinados en ratas machos jóvenes de estas S P F de raza Sprague Dawley; la duración del experimento ha sido de 17 días y el grado o concentración de proteínas en los alimentos era de 10%. Cada régimen ha sido reequilibrado con aminoácidos indispensables limitativos. Cada lote experimental comprendía 20 animales.

15 La composición de los regímenes y los resultados obtenidos figuran en la tabla V.

20 El análisis de los resultados de la tabla V muestra que las proteínas del Trichoderma Album poseían un valor nutritivo equivalente a la caseína láctica suplementada con metionina y superior al de las tortas cocidas de soja y de sésamo.

25 El reducido coeficiente de eficacia proteínica de la harina de altramuza cruda es debido a los factores antinutritivos contenidos en este grano. En cuanto al reducido valor nutritivo del hongo de París, para la rata, éste puede ser explicado indudablemente por el elevado contenido de carpóforos y paredes celulares. En efecto, en este caso, el

1 consumo es elevado.

EJEMPLO V

Selección de la cepa Trichoderma Album

5 Por el procedimiento de selección según el presente invento, se ha aislado, a partir de Trichoderma Viride, la nueva especie Trichoderma Album que es empleada en el procedimiento de obtención de proteínas, según el presente invento.

10 La especie Trichoderma Album posee pocas paredes; no produce antibióticos ni pigmentos difusibles, contrariamente a la especie Trichoderma Viride de la que se deriva. No posee hifas coloreadas y termófilas.

15 El género Trichoderma pertenece a la clase de los hongos filamentosos imperfectos (adelomicetos = hifomicetos), del orden de las Moniliales y de la familia de las Moniliaceas.

20 El micelio, compartimentado, ramificado, es de color desde blanco a verde claro. Los conidios, generalmente verdes, son aislados, redondos, monocelulares; son llevados por conidióforos verticilados.

Los Trichoderma son organismos saprófitos de los suelos. Se considera que son benéficos, ya que con frecuencia son antagonistas de hongos fitopatógenos. Producen numerosas enzimas y antibióticos.

25 Esta nueva especie ha sido obtenida por el procedimiento de selección según el invento.

30 Después de 1.400 ciclos (parciales o completos) realizados según el ciclo representado en la figura 3, se ha llegado a una cepa de Trichoderma polífaga, de rendimiento, inofensiva, cuyo micelio posee un elevado valor nu

1 tritivo para los animales.

La eliminación de los caracteres molestos escondidos e implicados por la cepa original, y la selección, realizada muy a fondo, de los rendimientos y cualidades alimenticias, confirman perfectamente los potenciales genéticos excepcionales que poseen los hongos.

La especie Trichoderma Album aislada posee, tal como se deduce claramente en la tabla VI siguiente, una velocidad de multiplicación y una eficacia energética elevadas. Esta nueva especie posee pocas paredes celulares, y un elevado índice de plasmólisis en caliente. Además, no posee hifas productoras de péptidos antibióticos, gliotoxina, tricotodermina y pigmentos; no comprende individuos termófilos y con micelio coloreado. Además, se hibrida muy mal con su antepasado, lo cual confirma que ha habido reestructuración genética.

En la tabla VI, se han indicado los resultados de análisis realizados con cultivos al cabo de 100, 300, 1.000 y 1.400 ciclos según el procedimiento, así como los resultados de análisis efectuados con la cepa Trichoderma Viride original.

La cepa Trichoderma Album puede ser conservada mediante trasplantes.

EJEMPLO VI

25 Aplicación del procedimiento de selección según el invento a las cepas Fusarium roseum, Bauveria Tenella, Trichoderma polysporum, Aspergillus oryzae

El procedimiento de selección de los microorganismos según el invento es aplicable a la mejora de otros microorganismos (hongos, levaduras, bacterias); ha permiti

1 do seleccionar gérmenes que poseen propiedades específicas bien definidas. En cada caso, es suficiente escoger bien los criterios de selección, los medios de cultivo, y utilizar técnicas de control adecuadas.

5

Mediante este procedimiento, se ha obtenido:

10

- un Trichoderma polysporum antagonista de los hongos fitopatógenos
- un Fusarium roseum sistémico, no patógeno y que aporta una protección de las plantas contra los fusariums fitopatógenos
- Aspergillus flavus que no producen aflatoxinas
- un Penicillium coconeum productor de aromas de queso de cabra
- Streptomyces productores de antibióticos híbridos
- bacterias y Streptomyces productores de endopeptidasas
- Acrostalagus aphidum hiperpatógenos para los pulgones.

15

20

La tabla VII ilustra algunos resultados.

25

Los resultados de la tabla VII muestran que a partir de material biológico de diferentes orígenes es posible alcanzar objetivos muy diversos y muy precisos. La selección de los caracteres interesantes escogidos y la eliminación de las propiedades molestas son más o menos largos o amplios, dependiendo de los microorganismos salvajes ensayados. Algunas veces, los obstáculos son importantes, y será preferible cambiar la cepa original para alcanzar la meta establecida. En todos los casos, se obtienen resultados interesantes.

30

1 EJEMPLO VIIRevalorización de concentrados de proteínas solubles de pes-
cado

5 Se ha utilizado un concentrado de proteínas solu-
bles de pescado con una concentración de 90% de proteínas
sobre materia seca. Se ha disuelto este concentrado en cua-
tro volúmenes de agua (peso/volumen).

10 En el dispositivo según el invento se han intro-
ducido 30 litros de la solución de concentrado definido an-
teriormente y 1 a 2 litros de Trichoderma Album obtenido
por cultivo sobre agitador.

Se ha mantenido la temperatura en 24-28°C y el
pH del medio en un valor comprendido entre 3,7 y 4,8.

15 Se han efectuado periódicamente retiradas para
determinar el amargor del concentrado de proteínas solubles
de pescado. Se ha detenido la reacción cuando el concentra-
do estaba desprovisto de amargor, es decir después de apro-
ximadamente 3 a 5 horas.

20 El producto obtenido era una mezcla de concentra-
do y de micelio que eventualmente se puede separar por fil-
tración o centrifugación.

25 En el ensayo de laboratorio antes expuesto se ha
utilizado como producto de partida un concentrado de pro-
teínas solubles de pescado, que se ha disuelto en agua pa-
ra obtener un medio nutritivo líquido. En la práctica se
puede hacer actuar Trichoderma Album directamente después
de la hidrólisis papaínica, tras separación de los materia-
les insolubles. Se evitan de este modo una etapa de secado
y una etapa de disolución, que son inútiles.

30

31058

1 EJEMPLO VIIIDepuración de los jugos de difusión de azucarera

5 Los jugos de difusión, que son los jugos de difusión obtenidos a partir de rajadas de remolacha, cristalizan difícilmente por causa de la presencia de impurezas, tales como por ejemplo fenoles y aminoácidos.

10 Si se trabaja según el procedimiento del invento utilizando, en calidad de medio nutritivo, un jugo de difusión, se obtiene por una parte un jugo clarificado que cristaliza bien y simplifica por esta razón la ulterior tecnología de fabricación del azúcar y por otra parte proteínas de Trichoderma Album. En efecto, el hongo empleado consume todo el nitrógeno presente como impureza en este jugo e hidratos de carbono y se obtiene un micelio que presenta las características definidas en la tabla I.

15 Por ejemplo, si se utiliza un jugo de difusión con una concentración de 17% de materia seca y que contiene 1% de N con relación a la materia seca, puede obtenerse por una parte un jugo clarificado con una concentración de 20 15% de materia seca y por otra parte 15 a 20 g/l de jugo de difusión con 50% de proteínas de Trichoderma Album.

25 Así, en lugar de obtener melazas, que son subproductos de la industria azucarera, se obtiene según el invento una fracción proteínica con una concentración de 50 a 65% de proteínas y se mejora la cristalización del azúcar.

TABLA V

Composición de los regímenes en %; GMQ; CEP

Regímenes	I	II	III	IV	V	VI	VII
Caseína láctica	12	0	0	0	0	0	0
Torta de soja cocida	0	22	0	0	0	0	0
Torta de sésamo cocida	0	0	20	0	0	0	0
Harina de altramuz "New Land" cruda	0	0	0	28	0	0	0
Hongos de París	0	0	0	0	25	0	0
Trichoderma Album secado sobre "Hatmaker"	0	0	0	0	0	20	0
Trichoderma Album liofilizado	0	0	0	0	0	0	18

TABLA V
(continuación)

Composición de los regímenes en %; GMQ; CEP

Regímenes	I	II	III	IV	V	VI	VII
Almidón de maíz	53,75	44,75	46,50	38,35	41,60	41,65	48,75
Glucosa	20	20	20	20	20	20	20
Aceite de cacahuete	8	8	8	8	8	8	8
Celulosa	2	1	1	1	1	1	1
Complemento vitamínico y mineral	4	4	4	4	4	4	4
DL-metionina	0,25	0,25	0	0,35	0,4	0,35	0,25
L-lisina, HCl	0	0	0,5	0,20	0	0	0
L-treonina	0	0	0	0,10	0	0	0

TABLA V
(continuación)

Composición de los regímenes en %: GMQ; CEP

Regímenes	I	II	III	IV	V	VI	VII
Peso medio de las ratas al comienzo (en g)	52	51	51	51	51	51	51
Peso medio de las ratas después de 17 días (en g)	129	111	119	70	85	132	131
Ingeridos /día/al (en g)	12,5	10,4	10,8	5,9	9,2	12	12
GMQ	4,5	3,5	4,0	1,1	2,0	4,8	4,7
CEP	3,7	2,9	3,0	1,7	2,0	3,7	3,6

TABLA VI

Cepas salvajes	100 pasadas	300 pasadas	1.000 pasadas	1.400 pasadas
6,00	5,00	3,50	2,30	1 a 2
5,00	4,00	3,50	2,00	1,60
12,5	9	7,4	3,4	2,5
40	45	47	60	65 a 70
1	1,5	2,7	7	10
10	20	40	55	60 a 70
35	45	50	50	50 a 60
18	15	9,5	2,2	0,7
2-5	1-2	0,5	0	0

TABLA VI
(continuación)

1.400 pasadas	0	70 a 75	3,9
1.000 pasadas	0	60 a 70	3,7
300 pasadas	0,5	50	-
100 pasadas	2	35	-
Cepas salvajes	12	20 a 25	-
Fragmentos termófilos (en o/oo)			
Grado de agotamiento de los medios en 48 h para 40 g de MS/l, pH = 4; 27°C; 4 a 8 mg de oxígeno no disuelto/l (en % MS)			
Coeficiente de eficacia proteica en una rata después de 17 días de régimen equilibrado que comprende 10% de proteí nas			

TABLA VII

Cepas salvejes	50 ciclos	200 ciclos	500 ciclos	1.000 ciclos		Cepas salvejes	
						Grisori- xina	Nigeri- cina
5	60	95	98	98	<u>TROCHODERMA POLYSPORIUM</u> Protección de judías con- tra Colletotrichum, Lin- demuthianum número de plantículas protegidas %		
1.200	25	0	0	0	<u>ASPERGILLUS FLAVUS</u> mg de aflatoxinas produ- cidas por litro de medio de cultivo		
0	15	25	55	70	<u>FUSARIUM ROSEUM</u> Protección del guisante contra los fusariums pa- tógenos número de planti- culas protegidas en %		
5	200	1.250	4.300	6.200	<u>STREPSOMYCES AUREUS</u> mg de endopeptidasa pro- ducida por litro de me- dio de cultivo		
0	200	650	2.300	2.300	<u>STREPTOMYCES GRISEUS</u> productor de nigericina mg de la grisonixina y de la nigericina produ- cida por litro	0	800
	350	0	0	0			

1

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS DE REFERENCIA (LETRAS Y NUME-
ROS) DE LAS FIGURAS 1 y 4 DE LOS DIBUJOS

Figura 1

5

A = productos, subproductos, desechos.

B₁ = triturasiones, homogeneizaciones.

B₂ = separaciones diferenciales.

C = fracciones sólidas.

D = fracciones líquidas.

10

E = tamizados selectivos.

F = minerales.

G = sustancias orgánicas.

H₁ = concentración.

H₂ = esterilización.

15

H₃ = adiciones.

H₄ = fermentación según el invento.

H₅ = separación.

I₁ = tratamiento por calor.

I₂ = tratamiento por álcalis.

20

I₃ = tratamiento por ácidos.

I₄ = separaciones.

J = sustancias húmicas = abonos.

K = fracciones líquidas.

L = micelio.

25

M = efluentes.

N₁ = secado.

N₂ = trituración.

N₃ = acondicionamiento.

Q = harina con 50-60% de proteínas.

30

P = abonos.

31058

1 Q = enzimas.

Figura 4

- 22 = inoculación de 11 medios sólidos.
- 5 23 = incubación un día a 27°C.
- 24 = incubación dos días a 37°C en oscuridad.
- 25 = incubación dos días a 37°C a la luz.
- 26 = incubación dos días a 27°C.
- 10 27 = desecho de todos los cultivos mal desarrollados, coloreados, que producen pigmentos o que oxidan los medios.
- 28 = exposición a ultravioletas (250 nm) durante dos horas a +40°C de cepas blancas y vigorosas.
- 29 = transplante a medio STARON.
- 30 = incubación dos días a 37°C.
- 15 31 = las cepas que se desarrollan son rechazadas.
- 32 = incubación dos días a 27°C.
- 33 = incubación dos días a 27°C.
- 34 = desecho de todos los cultivos mal desarrollados, coloreados, que producen pigmentos o que oxidan los medios.
- 20 35 = microaislamientos.
- 36 = incubación dos días a 27°C.
- 37 = cultivo agitado en medio líquido STARON durante dos días a 27°C.
- 25 38 = rechazo de todos los cultivos coloreados.
- 39 = recolección y separación.
- 40 = jugos.
- 41 = determinaciones.
- 41-1 = pH.
- 30 41-2 = oxígeno disuelto.

- 1 - 41-3 = contenido de materia seca.
41-4 = nitrógeno total.
41-5 = péptidos antibióticos.
41-6 = tricodermina.
- 5 41-7 = gliotoxina.
42 = retiradas estériles.
43 = micelio escurrido hasta peso seco durante una noche a 60°C.
44 = determinaciones.
- 10 44-1 = contenido en materia seca.
44-2 = contenido en proteínas.
44-3 = contenido en glicosamina.
44-4 = intensidad de la plasmólisis.
45 = mezclado en presencia de acridina naranja de las ce
- 15 pas de más rendimiento ricas en proteínas, y pobres en glicosamina y antibióticos.
46 = incubación en medio STARON dos días a 27°C.
47 = microaislamientos.
48 = incubación dos días a 27°C.

20

25

31058

REIVINDICACIONES

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

10 1ª.- Procedimiento de selección de caracteres interesantes de un microorganismo, caracterizado porque consiste en cultivar una cepa salvaje sobre medios de cultivo selectivos, en incubar los cultivos en condiciones específicas de temperatura y de iluminación, en proceder a micro-aislamientos y mezclas las cepas mejoradas en presencia, o no, de acridina naranja, con nuevo aislamiento de las hifas blancas.

15 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque consiste: 1) en inocular los medios selectivos con una cepa salvaje; 2) en incubar cada cultivo en las condiciones siguientes: a) a 27°C durante un día; b) a 37°C durante dos días en la oscuridad y luego durante dos días a la luz; c) a 27°C durante dos días; 3) en exponer seguidamente a los rayos ultravioletas (250 nm) a las cepas blancas y vigorosas que provienen de cada cultivo efectuado sobre los medios selectivos, durante dos horas a 4°C; 4) en trasplantar las cepas sobre el medio "STARON"; 20 5) en incubar los cultivos resultantes durante dos días a 37°C y luego durante dos días más a 27°C, tras haber eliminado, antes de la disminución de temperatura de 37 a 27°C, las cepas que se desarrollan; 6) en cultivar dichas cepas

sobre el medio líquido y agitado de STARON durante dos días a 27°C; 7) en proceder a retiradas estériles; 8) en mezclar en presencia de acridina naranja las cepas de mayor rendimiento, ricas en proteínas, y pobres en glicosamina y antibióticos; 9) en incubar las cepas resultantes sobre el medio STARON durante dos días a 27°C; 10) en proceder a micro-aislamientos; y 11) en incubar durante dos días las cepas resultantes a 27°C; las cepas así obtenidas son sometidas de nuevo al ciclo antes definido, etapas 1) a 11), durante un número de ciclos suficientes para obtener una cepa que posea las características deseadas.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque los cultivos son sometidos eventualmente a ciclos parciales cuyas etapas son definidas en función de los controles realizados en el ciclo precedente.

4ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, de selección de Trichoderma Album a partir de Trichoderma Viride, caracterizado porque los medios selectivos empleados están en un número de 11, entre los cuales ocho medios están constituidos por una solución mineral de pH 6,8 que contiene los siguientes constituyentes: $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1 \text{ g}$; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O} = 0,5 \text{ g}$; $\text{KCL} : 0,2 \text{ g}$; $\text{CaCl}_2 = 0,2 \text{ g}$; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O} = 0,03 \text{ g}$; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O} = 0,01 \text{ g}$; $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O} = 2 \text{ mg}$; agua destilada en cantidad suficiente para 1.000 mililitros; gelosa = 20 g, a la que se han añadido los componentes siguientes:

- medio 1) 30 g de glicerina + 2 g de urea;
- medio 2) 20 g de sacarosa + 3 g de alantoina;
- medio 3) 20 g de almidón + 5 g de sulfato de amonio;
- medio 4) 20 g de glucosa + 7 g de tirosina;

medio 5) 5 g de pectina de manzanas + 7 g de ácido antranílico;

medio 6) 20 g de almidón + 5 g de nitrato de sodio;

medio 7) 10 g de manita + 8 g de caseína láctica;

5 medio 8) 20 g de ácido glucónico + 10 g de gelatina,

el medio 9 es el medio "STARON" que contiene glucosa = 20 g; peptona = 6 g; extracto de levadura = 1 g; líquido de

maceración de maíz = 4 g; NaCl = 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ = 0,5 g, KH_2PO_4 = 1 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ = 10 mg; agua destilada: can-

10 tidad suficiente para 1 litro; gelosa = 20 g para medios sólidos; el medio 10 está constituido por patatas nutritivas y el medio 11 es suero láctico con 40 gramos/litro.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 4ª, caracterizado porque los cultivos son sometidos eventual-

15 mente a ciclos parciales que comprenden las etapas 1 a 4 definidas en la reivindicación 13ª, seguidas por etapas que consisten en proceder seguidamente a una incubación durante dos días a 27°C y luego a microaislamientos para seleccionar las cepas blancas y vigorosas y seguidamente a

20 una incubación, todavía durante dos días más a 27°C, de estas cepas blancas y vigorosas, siendo las cepas así obtenidas inoculadas seguidamente con los once medios selectivos y sometidas a un ciclo completo o parcial.

6ª.- Procedimiento según una cualquiera de las

25 reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque las cepas salvajes se escogen entre las bacterias, los estreptomicos y los hongos especialmente los ficomicetos (*Rhizopus*), los basidiomicetos (*Ustilago*, *Corticium*, *Fomes*, *Taphrina*, *Sclerotinia*, *Rhabdocline*, *Phacidiella*, *Epichloe*, *Nectria*, *Ophiobolus*, *Endothia*); los adelomicetos (*Phoma*, *Ascochyta*, *Septo*

30

ria, Colletotrichum, Gloeosporium, Monilia, Sterigmatocystis, Gliocladium, Geotrichum, Acrostalagmus, Trichoderma, Botrytis, Cephalosporium, Verticillium, Trichothecium, Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Pullularia, Torula, Thielaviopsis, Alternaria, Cercospora, Sporadesmium, Helminthosporium, Epicoccum, Graphium).

5

7ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque las cepas salvajes se escogen entre: Trichoderma Viride, Fusarium roseum, Bauveria Tenella, Trichoderma polysporum y Aspergillus oryzae.

10

8ª.- Procedimiento de selección de caracteres interesantes de un microorganismo.

15

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

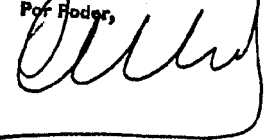
Esta Memoria consta de cincuenta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid, 18.DIC.1978

P.A.

Alberto de Ezaburu
Prof. Poder,



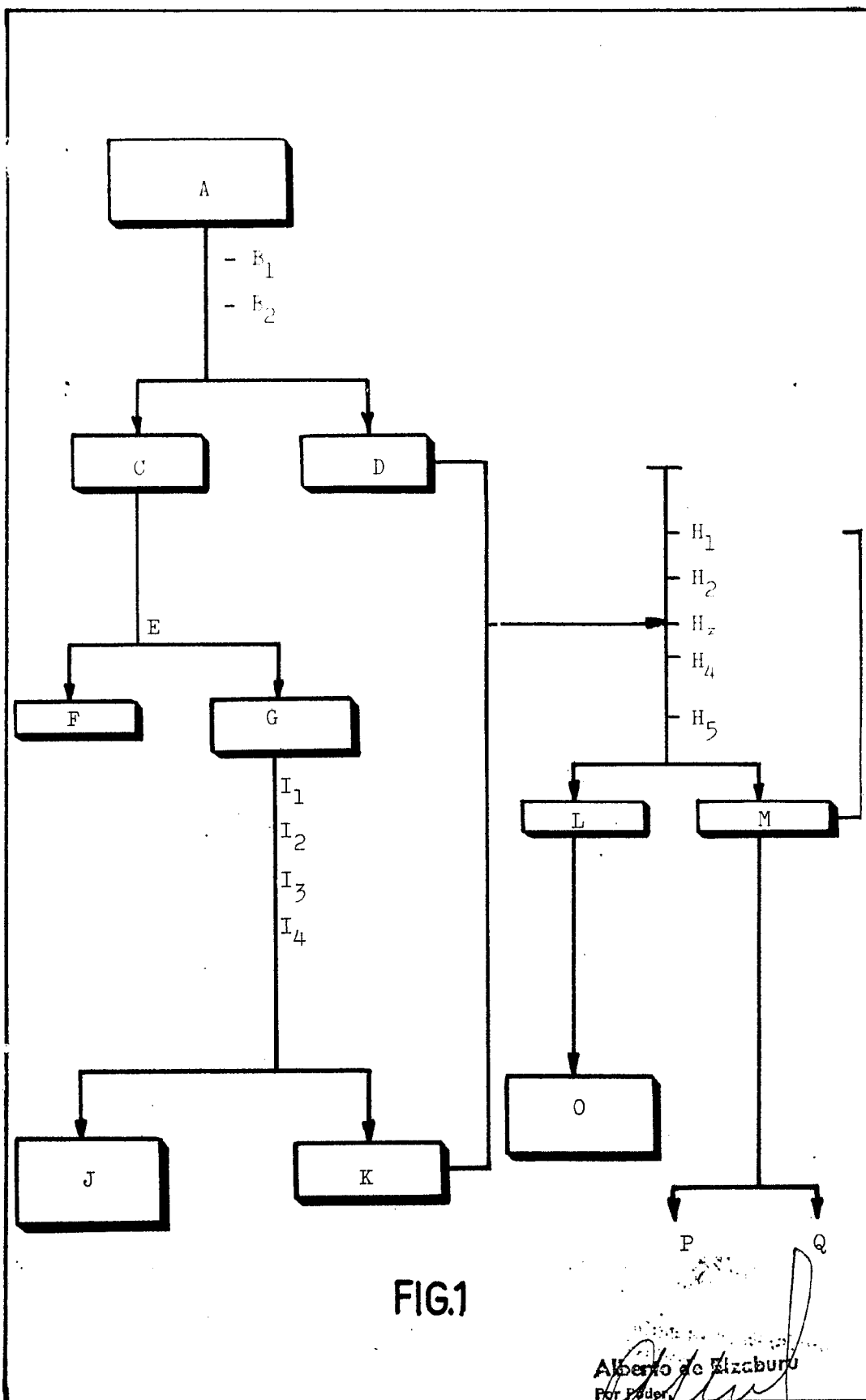


FIG.1

Alberto de Elizaburo
For Editor

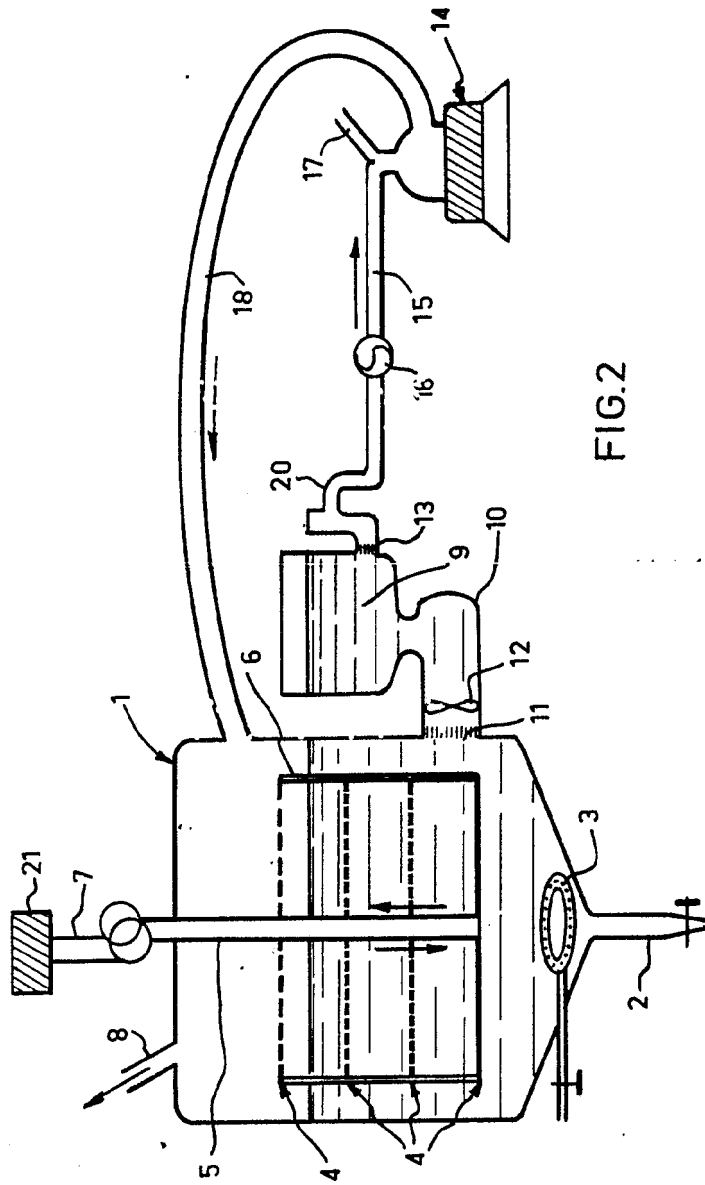
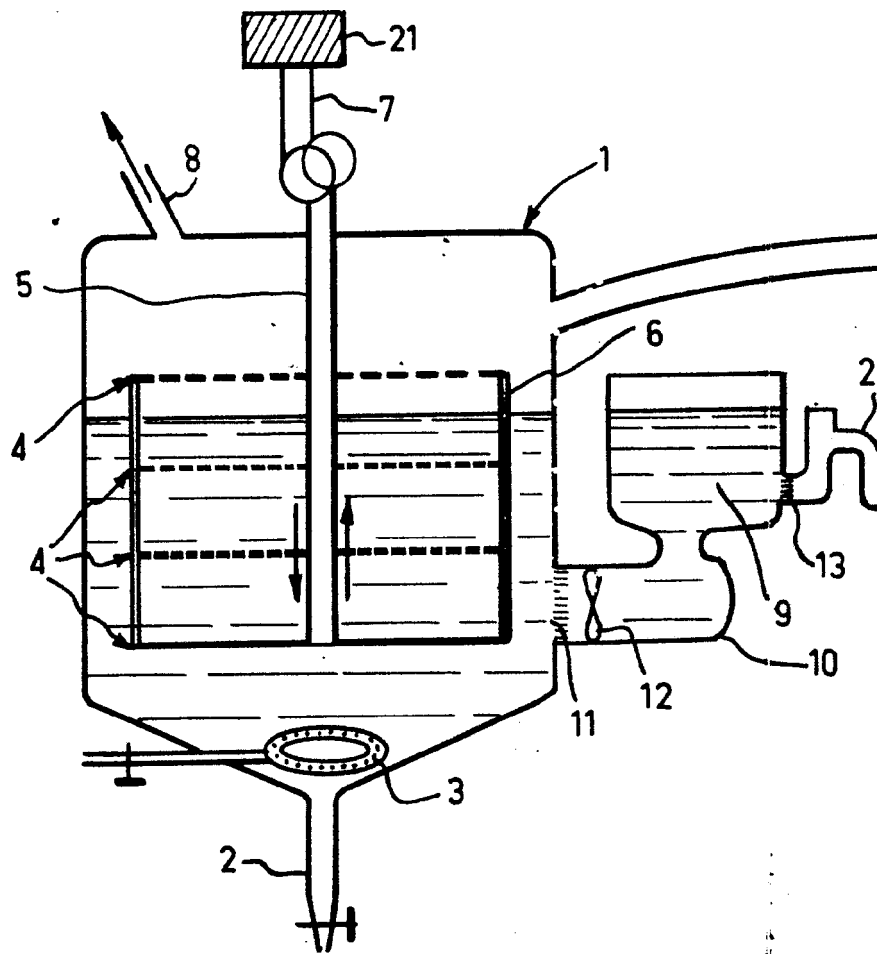


FIG. 2

Alberto de Elizabete
Ingeniero



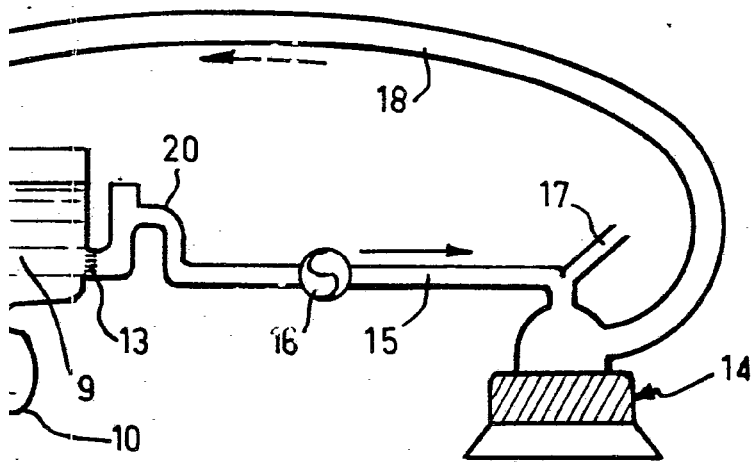


FIG.2

Alberto de Elzaburu
Por Edsdy

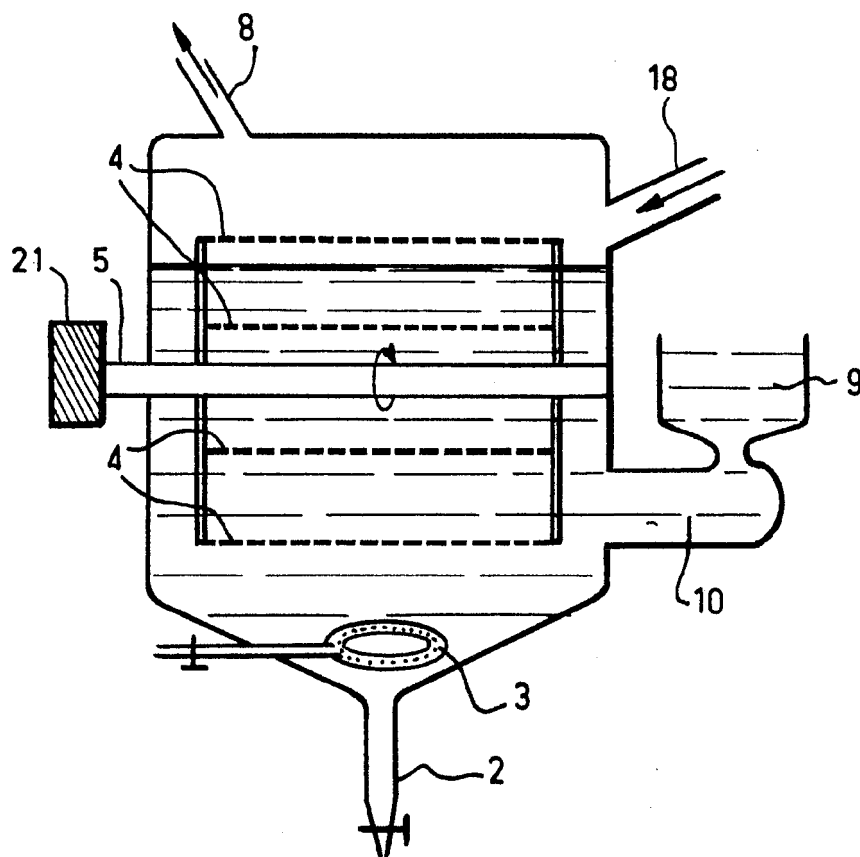


FIG.3

Alberto de Elzola
Por el autor

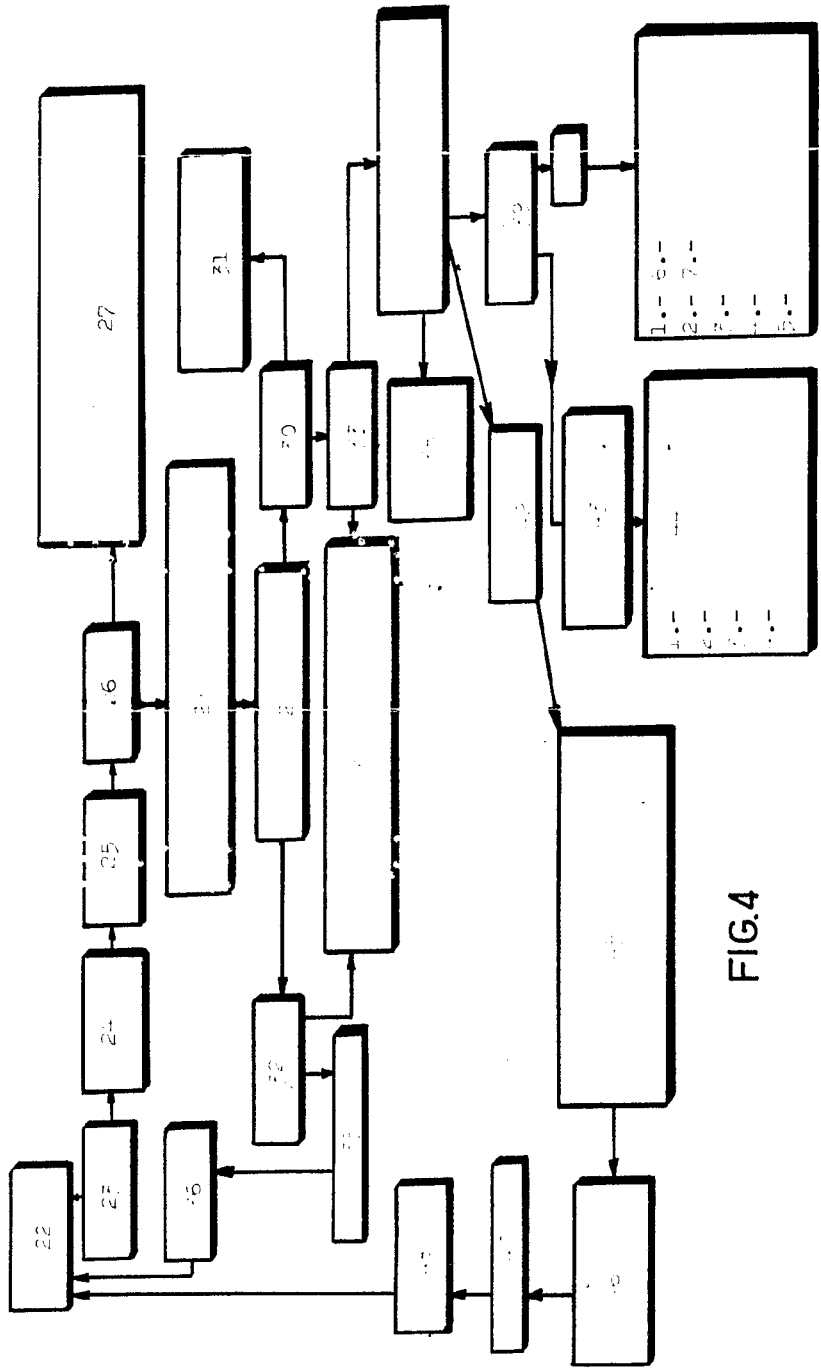


FIG.4

Alberto de Elzaburu
Perkins

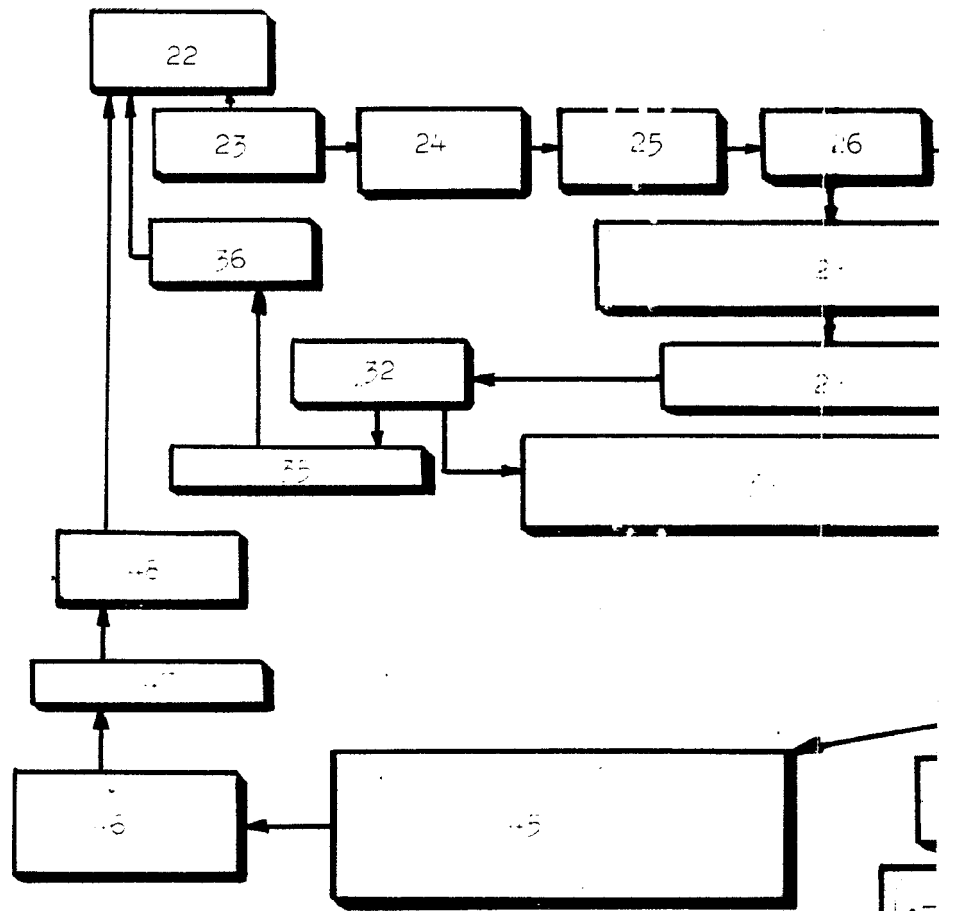
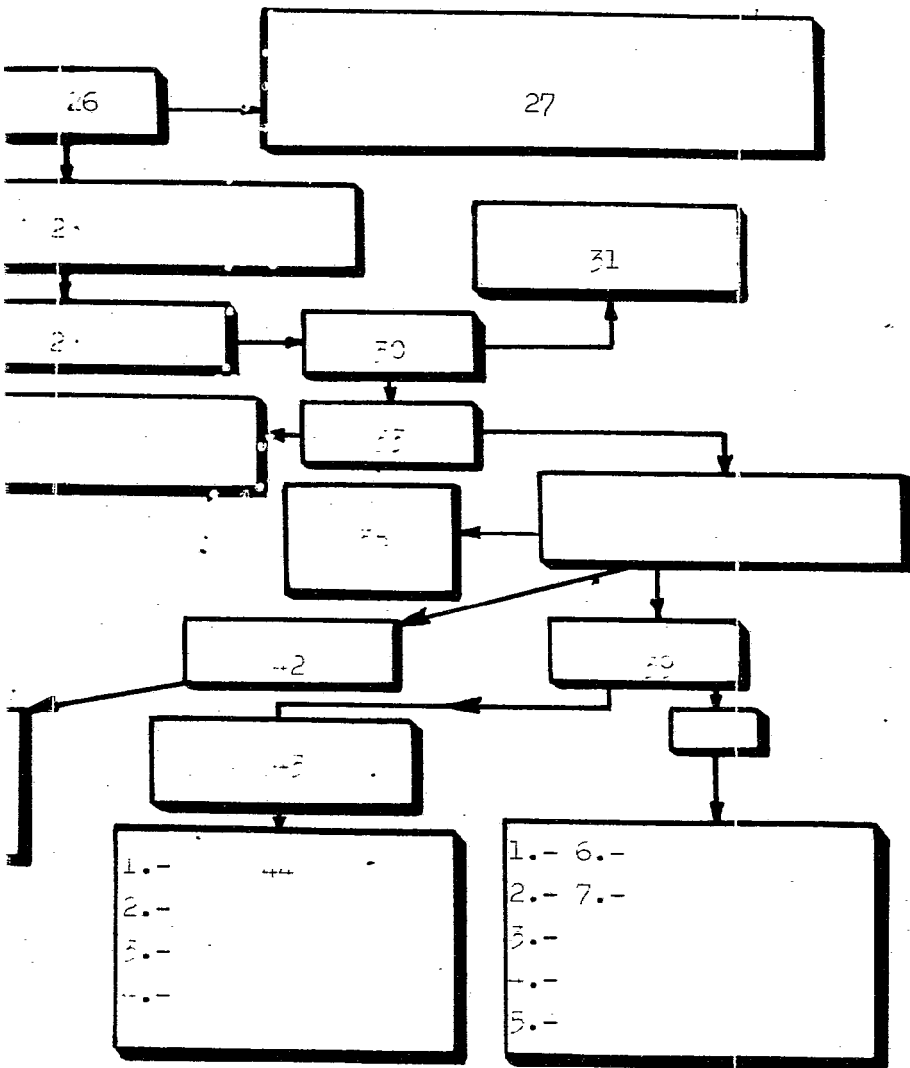


FIG.4

59157



Alberto de Elizaburu
Por Poderes