(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 103 687**

(21) Número de solicitud: 9600351

(51) Int. Cl.[6]: C12P 19/44
C07H 15/00
//(C12P 19/44
C12R 1:72)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **14.02.96**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.97**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.09.97**

(71) Solicitante/s:
Universidad Complutense de Madrid
Rectorado- Avda. Séneca, 2
28040 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **García-Ochoa Soria, Félix y Casas de Pedro, Jose Antonio**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de soforolípidos a partir de azúcares y aceite utilizando calculas desenergetizadas de Candida bombicola.**

(57) Resumen:
Procedimiento para la producción de soforolípidos a partir de azúcares y aceite utilizando células desenergetizadas de *Candida bombicola*.
Los soforolípidos son moléculas de características tensioactivas formados por la unión de un azúcar (soforosa) a una cadena lipídica. Estos compuestos son sintetizados por ciertos microorganismos entre los que se encuentra la levadura *Candida bombicola*, siendo esta la que los produce en mayor cantidad. En este trabajo se ha desarrollado un procedimiento capaz de incrementar sensiblemente la cantidad de soforolípidos sintetizados por esta levadura respecto a los descritos en la literatura, el procedimiento patentado se basa en la utilización de células, de *Candida bombicola* en estado desenergetizado, es decir, cuando se hallan en la etapa estacionaria de su crecimiento y en la utilización de medios tanto de crecimiento como de producción optimados.

ES 2 103 687 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para la producción de soforolípidos a partir de azúcares y aceite utilizando células desenergetizadas de Candida bombicola.

Objeto de la invención

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a la producción de soforolípidos, moléculas de características tensioactivas. Estos productos son utilizados como surfactantes en la industria cosmética, como se indican Velikonja y Kosaric, 1993 (en "Biosurfactants", ed. por *Josaric*, Marcel Dekker, 1993). Estos compuestos se sintetizan empleando un medio de producción que contenga azúcar (glucosa) y aceite vegetal, preferentemente aceite de girasol, y utilizando células de la levadura *Candida bombicola* en estado desenergetizado, es decir, células de levadura que hayan alcanzado la fase estacionaria de su crecimiento.

Antecedentes

La levadura *Candida bombicola* tiene la propiedad de segregar, al medio de cultivo donde crece, unas moléculas de características tensioactivas denominadas soforolípidos (Tulloch y col., 1962, *Can. J. Chem.* 40:1326-1338; Tulloch y col., 1968, *Can. J. Chem.* 46:3337-3351; Tulloch y Spencer, 1972, *J. Org. Chem.* 37: 2868-2870; Ito e Inoue, 1982, *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1278-1283). La producción de estas moléculas se ve fuertemente incrementada cuando el medio de crecimiento está compuesto por un azúcar y un aceite o un compuesto de carácter lipídico (Tulloch y col., 1962, *Can. J. Chem.* 40:1326-1338). La síntesis de los soforolípidos siempre se realiza una vez que la levadura alcanza la fase estacionaria del crecimiento; en este momento el microorganismo, por la carencia de un nutriente esencial para su desarrollo, deja de reproducirse y altera su metabolismo para sintetizar moléculas de reserva energética (Göbbert y coll., 1984, *Biotech. Letts.* 6:225-230; Davila y col., 1992, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:6-11).

En la literatura se describen varias formas de operar en la producción de los soforolípidos (Tulloch y Spencer, 1972, *J. Org. Chem.* 37:2868-2870; Göbbert y col., 1984, *Biotech. Letts.* 6:225-230; Davila y col., 1992, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:6-11; Lee y Kim, 1993, *Biotech. Lett.* 15:236-266). Habitualmente la síntesis de estas moléculas se realiza por un procedimiento denominado discontinuo que consiste en introducir dentro del fermentador el medio de producción y la levadura, para que tras un proceso de crecimiento se dé la producción del tensioactivo (Ito y col., 1980, *Agric. Biol. Chem.* 44:2221-2223; Cooper y Paddock, 1984, *Appl. Environ. Microbiol.* 47:176-176; Klekner y col., 1991, *Biotechnol. Lett.* 13:345-348; Zhou y col., 1992, *JAOCS.* 69:89-91). En otros trabajos se procede de idéntica manera y, además, se adiciona de forma continua una fuente carbonada, normalmente la de naturaleza lipídica (Davila y col., 1992, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:6-11; Lee y Kim, 1993, *Biotech. Lett.* 15:263-266), esta forma de producción se denomina semicontinuo y hasta el momento parece ser la que mejores resultados, respecto a la producción de soforolípidos, ha dado, siempre y cuando ambas fuentes de carbono hayan estado presentes en el medio desde un principio. Cuando se procede primero al crecimiento de la levadura y, sobre el mismo medio de crecimiento, se adiciona una nueva fuente de carbono se ha comprobado que la producción de los soforolípidos es prácticamente nula, debido a algún compuesto inhibidor generado durante la fase del crecimiento.

Existe un tercer procedimiento consistente en crecer las células de la levadura en un medio que contenga una única fuente de carbono, normalmente glucosa, una vez que la levadura alcanza la fase estacionaria del crecimiento separarla de él y después de lavarla introducirla en un nuevo medio. En la literatura solamente se recoge un estudio en el que se realice este proceso (Göbbert y col., 1984, *Biotech. Letts.* 6:225-230), aunque, seguramente debido a la composición del medio que utiliza, esta forma de operar obtiene menor concentración de soforolípido que cuando realiza el crecimiento en discontinuo.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención una elevada concentración de soforolípidos (100 g/l en 180 h) a partir de un medio de producción que contenga 100 g/l de glucosa, 100 g/l de aceite de girasol, 1 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de células de la levadura *Candida bombicola* que se encuentren en la fase estacionaria de su crecimiento (desenergetizadas). La concentración de soforolípidos conseguida y el rendimiento que se obtiene respecto a las fuentes de carbono son muy superiores a los encontrados en la literatura (Tulloch y Spencer, 1972, *J. Org. Chem.* 37:2868-2870; Ito y col., 1980, *Agric. Biol. Chem.* 44:2221-2223; Ito e Inoue, 1982, *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1278-1283; Göbbert y col., 1984, *Biotech. Letts.* 6:225-230; Cooper y Paddock, 1984, *AApl. Environ. Microbiol* 47:173-176; Asmer y col., 1988, *JAOCS* 65:1460-1466; Klekner y col., 1991, *Biotechnol. Lett.* 13: 345-348; Davila y col., 1992, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 6-11; Lee y Kim, 1993, *Biotech. Lett.* 15:263-266). Luego la novedad en esta patente consiste en la utilización de un procedimiento que permite disminuir el coste de los soforolípidos producidos.

Modo de realización de la invención

El procedimiento seguido se describe en los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Mantenimiento del organismo productor

Para la producción de los soforolípidos se ha utilizado la levadura *Candida bombicola*, un microorganismo de colección procedente de Microbiology Collection, Fermentation Laboratory, Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Estados Unidos, recogido bajo el nombre *Candida bombicola NRRL Y-17069*. La muestra liofilizada, suministrada por el laboratorio, fue sembrada en un medio de crecimiento rico en nutrientes, cuando el microorganismo se halla en la fase exponencial del crecimiento (12 h después de la siembra) se toma una muestra con el asa de siembra y se realiza una siembra sobre agar inclinado que contenía medio YM, este medio está compuesto por: 3 g/l de extracto de malta, 3 g/l de extracto de levadura, 5

g/l de peptona, 10 g/l de glucosa. Este soporte permite conservar el microorganismo durante, al menos, 15 días en forma viable, al terminar este plazo se resiembra con un asa de siembra algunas colonias en un nuevo tubo de agar inclinado.

Ejemplo 2

Crecimiento del microorganismo. Producción de biomasa

El crecimiento de la levadura *C. bombicola NRRL Y-17069* se realiza utilizando una pequeña cantidad de células procedentes del medio de conservación YM mencionado (en un tubo de agar inclinado) e introduciendo estas colonias en un medio líquido de crecimiento compuesto por: glucosa (10 g/l), extracto de levadura (2 g/l) y base nitrogenada para levaduras (7,5 g/l) a pH = 5,6. Para realizar experimentos repetitivos es necesario conocer la concentración de biomasa con la que se inicia el cultivo (inóculo) y, también es necesario que todas las levaduras estén en una misma fase del crecimiento, por lo que este primer crecimiento va a permitir obtener los microorganismos que en una concentración fija, servirán para inocular un nuevo medio de crecimiento con una claridad de biomasa determinada. La concentración de biomasa se determina por turbidimetría, midiendo la absorbancia a 650 nm, correlacionándola con la concentración mediante la siguiente ecuación: $[B] = 0{,}3142 * Abs$, donde [B] es la concentración de biomasa expresada en g/l y Abs la medida de absorbancia. Utilizando el medio propuesto anteriormente, una concentración inicial de biomasa de 0,1 g/l y las siguientes condiciones de operación: 30°C, 600 rpm y 1 1N/l/min de aire (cuando se utiliza un fermentador marca INFORS, modelo ISF-101, de 2 l de volumen total y 1,5 l de volumen útil, existiendo una transporte de oxígeno en el medio correspondiente a un valor del coeficiente volumétrico de transporte de 0,012 s^{-1}) se obtiene, a las 28 h, momento en el que la levadura alcanza la fase estacionaria de la producción, una concentración de biomasa (levadura no deshidratada) correspondiente a 8 g/l.

Ejemplo 3

Separación de las células productoras y producción

Una vez que las células de *Candida bombicola* dejan de reproducirse, cuando llegan a la etapa estacionaria de su crecimiento, son separadas del medio de crecimiento por centrifugación, para ello se utilizó una centrífuga marca SORVALL, modelo RC-5B, utilizando el rotor GS3. Las levaduras fueron separadas del medio por centrifugación durante 10 minutos a 2500 g y a una temperatura controlada de 10°C, una vez aisladas son introducidas en un nuevo medio de producción formado por: 100 g/l glucosa, 100 g/l de aceite de girasol y 1 g/l de extracto de levadura. En este nuevo medio la levadura empieza a producir soforolípidos prácticamente desde que es introducida en el fermentador descrito anteriormente, obteniéndose una concentración de soforolípidos de 100 g/l en 180 h cuando se utilizan las siguientes condiciones: un fermentador de 2 l de volumen con 1,5 de volumen útil, con una agitación de 600 rpm, temperatura controlada e igual a 30°C y aportando un caudal de aire correspondiente a 1 1N/l/min. En estas condiciones el valor del coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno, $K_L A_v$, es de 0,011 s^{-1}.

El medio de producción al cabo de 180 h estará compuesto por aproximadamente: 27 g/l de biomasa (levaduras), 40 g/l de aceite, 103 g/l de soforolípidos, 0,5 g/l de glucosa, y en pequeñas cantidades compuestos originados por el metabolismo celular, hidroxiácidos grasos, soforosa y ácidos orgánicos de bajo peso molecular. La presencia de intermedios metabólicos en el medio permite aumentar la concentración de soforolípidos con el tiempo, aunque este aumento es muy lento. Si la levadura agota todos los nutrientes carbonados reutiliza los soforolípidos sintetizados degradándolos para su consumo. El consumo total del nutriente carbonado, glucosa en este caso, indica el momento más favorable para detener la producción de soforolípidos, que en estas condiciones está en torno a las 180 h.

Ejemplo 4

Aislamiento de los soforolípidos sintetizados

Los soforolípidos producidos en las condiciones en las que han sido sintetizados (pH ácido) son poco solubles, se hallen en suspensión dentro del medio y se pueden separar por centrifugación (en las mismas condiciones utilizadas para la separación de la levadura del medio de crecimiento). Aunque la utilización de esta técnica de separación, además de no ser capaz de recuperar todos los soforolípidos, arrastraría las células de levadura, que también se encuentran en suspensión. El proceso de separación utilizado ha sido por sucesivas extracciones siguiendo el presente protocolo:

1.- Se toma un volumen del medio de producción y se mezcla íntimamente con cuatro volúmenes de n-hexano, la mezcla se realiza por agitación mecánica.

2.- La fase orgánica (n-hexano) extrae el aceite no consumido y algunos ácidos grasos de cadena larga. La separación de las fases se realiza por centrifugación, utilizando una centrífuga marca SORVALL, modelo RC-5B, con el rotor GS3 y a 2500 g durante 10 minutos, controlando la temperatura a 10°C.

3.- En la fase acuosa quedan las levaduras, los soforolípidos y el resto de nutrientes. Dadas las condiciones del medio, los soforolípidos son poco solubles en él, por lo que es necesario suspenderlos y extraerlos, nuevamente, por adición de acetato de etilo (cuatro volúmenes por volumen de medio utilizado). La totalidad de las moléculas de soforolípidos pasan a la fase orgánica. Nuevamente, ambas fases son separadas por centrifugación, tal y como ha sido explicado anteriormente. Las moléculas de soforolípidos se obtienen en forma líquida por evaporación del disolvente.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de soforolípidos a partir de azúcares y aceite utilizando células desenergetizadas de *Candida bombicola*. **Caracterizado** porque se utilizan células de la levadura *Candida bombicola* cuando han alcanzado la fase estacionaria del crecimiento, y solamente en este estado; para después de separadas del medio en el que han crecido sean utilizadas como productoras de soforolípidos al ser introducidas en un medio de composición definida: azúcar, aceite o ácidos grasos de cadena larga y extracto de levadura. Este proceso debe realizarse utilizando un biorreactor y condiciones definidas de temperatura, agitación y transporte de oxígeno.

2. Procedimiento para la producción de soforolípidos según la reivindicación 1, **caracterizado** por la utilización de un medio de crecimiento para la levadura por los siguientes nutrientes en las concentraciones descritas: Glucosa (entre 2 y 100 g/l), KH_2PO_4 (entre 4 y 9 g/l), NH_4Cl (entre 1 y 3 g/l), 0,2 g/l $MgCl_2 \cdot H_2O$, 0,1g/l NaCl, trazas de Fe, Zn, B y Ca y extracto de levadura (utilizando una concentración comprendida entre 0,1 y 3 g/l).

3. Procedimiento para la producción de soforolípidos según la reivindicación 1, **caracterizado** por la utilización de un medio de producción compuesto por los siguientes nutrientes y en las concentraciones que se detallan: glucosa (entre 50 y 600 g/l), aceite (entre 10 y 500 g/l) y extracto de levadura (entre 0,01 y 3 g/l).

4. Procedimiento para la producción de soforolípidos según la reivindicación 1 y 3, **caracterizado** por la utilización de aceite de girasol para la producción de soforolípidos en las concentraciones comprendidas entre 10 y 300 g/l.

5. Procedimiento para la producción de soforolípidos según la reivindicación 1, **caracterizado** por la utilización de las siguientes condiciones de operación: temperatura comprendida entre 25 y 35°C, coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno comprendido entre 0,0001 y 0,1 s^{-1}.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 103 687

(21) N.° solicitud: 9600351

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **14.02.96**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.^{6}:** C12P19/44, C07H15/00 // (C12P19/44, C12R1:72)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCIA, S. et al., "Optimization of a synthetic medium for Candida bombicola growth", IchemE Res. Event-Eur. Conf. Young Res.Chem.Eng. 1st (1995), vol. 2, pp.:1073-5, Publisher: Inst.Chem.Eng., Rugby, UK * todo el documento *	1-5
X	ASMER, H.J. et al., "Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids", (1988), JAOCS, 65 (9), pp.:1460-1466 * todo el documento *	1-5
A	HOMMEL, R.K. et al., "Regulation of sophorose lipid production by Candida (Torulopsis) apicola", 1993, Biotech. Lett., 15 (8), pp.: 853-858 * todo el documento *	1-5
A	WO-92/11381-A (INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE) 09.07.92 * todo el documento *	1-5
A	FR-2691975-A (INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE) 10.12.93 * todo el documento *	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

[×] para todas las reivindicaciones

[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
31.07.97	A. Maquedano Herrero	1/1

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) N.° de publicación: 2 103 687 A1

(21) Número de solicitud: 9600351

(51) Int. Cl.[6]: C12P 19/44
C07H 15/00
//(C12P 19/44
C12R 1:72)

CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE

Pág./INID	Errata	Corrección
1, (54)	Título: "...calculas..."	"...células..."