



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

N.º de publicación: ES 2 050 066

Número de solicitud: 9200513

Int. Cl.⁵: C12N 1/16

A23J 1/20

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **06.03.92**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.94**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.94

(71) Solicitante/es: **Universidad del País Vasco
Rectorado-Otri-Campus de Leioa
48940 Leioa, Vizcaya, ES**

(72) Inventor/es: **Castrillo Diez, Juan Ignacio;
Diez Lopez, R.; Moreno Zaldibar, E.;
Hernández Alvarez, J.; Perea Villamil, J.A.;
Díaz Bada, L.I.; Willets, A. y
Ugalde Martínez, Unai Ona**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Producción de proteína unicelular a partir de lactosuero.**

(57) Resumen:

Producción de proteína unicelular a partir de lactosuero que comprende tres etapas:

1) Pretratamiento del lactosuero (1-4), consistente en desproteínización (1), suplementación con nutrientes (2) y pasteurización (4). 2) Etapa de fermentación utilizando la levadura *Kluyveromyces marxianus* (sinónimos *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus*) (5-13). El fermentador de trabajo (12), inoculado a partir de un fermentador previo (10) es aireado continuamente (6) y controladas las variables pH, temperatura y espumas. 3) Etapa de separación/recogida del producto (14-19). La crema de levaduras rica en proteína es separada del efluente por centrifugación (14), molida, secada (18) y recogida como producto final (19). El procedimiento puede ser aplicado en dos regímenes. 1) En régimen continuo, el fermentador (12) tras una primera etapa en semicontinuo opera en cultivo continuo en estado estacionario. 2) En régimen semicontinuo, un flujo de entrada progresivamente creciente desde el volumen inicial inoculado hasta el volumen total final a procesar.

DESCRIPCION

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca dentro de los sectores de industrias de depuración medioambiental (biotecnología ambiental), fermentación e industria quesera y de lechería, y en la industria alimentaria.

Estado de la técnica

La utilización del lactosuero como medio de cultivo para levaduras fue iniciada por Porges (Porges N., Pepinsky, J.B. y Jasewiez, L. (1951) *Journal of Dairy Science* **34**, 615-621) y posteriormente desarrollada por Wasserman y colaboradores (Wasserman, A.E., Hopkins, W.S. y Porges, N. (1958) *Sewage and industrial wastes* **30**, 615-621.; Wasserman, A.E. (1960) *Dairy Engineering* **77**, 12-17), empleando *Kluyveromyces marxianus* en proceso discontinuo (batch).

Estos estudios preliminares sentaron las bases para un número de procesos industriales.

En 1956 Fromageries "La Bel" comenzó a aplicar un proceso continuo que en la actualidad procesa cerca de 250.000 litros/día de lactosuero. El proceso consiste en una fermentación continua empleando una flora mixta de levaduras (Moulin, G., Malige, B. Y Galzy, P. (1983) *Journal of Dairy Science* **66**, 21-28.). Además la "Société des alcools de Vexin" ha desarrollado un sistema continuo de fermentación cuyo producto es sometido a concentración y secado por atomización. Un proceso similar ha sido puesto en marcha por "Knudsen Creamery Company" en Estados Unidos, produciendo 500 Tn/año de levadura a partir de suero dulce (Sullivan, A.C. (1972) *Dairy Industries* **37** (10), 561-563).

La cepa de *Kluyveromyces marxianus* (NCYC 1424) ha sido seleccionada por sus altos índices de productividad en cultivo continuo por los autores de la patente (Willetts, A. y Ugalde, U.O. (1987) *Biotechnology Letters* **9** (11), 795-800). Sin embargo, el comportamiento de esta cepa en cultivo continuo en lo que respecta a requerimientos nutricionales así como condiciones de cultivo, con el objeto de obtener alta productividad en biomasa a partir de lactosuero no ha sido descrito, siendo objeto de estudio en la actualidad.

Descripción de la invención

Se describe un nuevo procedimiento para el aprovechamiento de lactosuero por fermentación, en régimen continuo y semicontinuo, para la producción de proteína unicelular (single-cell protein), con aplicación en la industria alimentaria.

Permite eliminar en más de un 90% el poder contaminante del lactosuero, obteniéndose un producto comparable con la levadura de cerveza o la soja, que puede destinarse a la alimentación humana o animal. El efluente puede ser vertido con mínimos problemas de contaminación.

Una de las características que distingue a esta invención de procesos existentes hasta ahora es permitir la aplicación de la tecnología de fermentación de lactosa a plantas o grupos de plantas cuyos bajos volúmenes de producción hacen económicamente inviable utilizar otras soluciones.

Se basa en un procedimiento de fermentación que puede utilizar distintos volúmenes de producción de lactosuero, en régimen continuo o se-

micontinuo, sin requerir grandes espacios, y sin alterar significativamente el régimen de trabajo convencional de la quesería.

Se caracteriza por ser un proceso flexible que puede ser aplicable a distintas escalas o regímenes de producción de lactosuero, variables entre los distintos centros de producción, así como a lo largo de los distintos periodos estacionales.

Otra característica diferenciadora del proceso es que los nutrientes necesarios para la fermentación han sido estudiados y fijados sus niveles a fin de obtener un medio de cultivo óptimo utilizando compuestos como urea y vitaminas, eliminando el extracto de levadura, lo que hace se consiga un abaratamiento del proceso a la vez que se disminuye la formación de espumas.

El proceso, aplicado a las industrias queseras conduce a una mejora económica del proceso global, en primer lugar por supresión de las sanciones por contaminación del medio ambiente; en segundo lugar, suponiendo una nueva fuente de ingresos a partir de la comercialización del producto.

Descripción detallada

El lactosuero es un subproducto de la industria quesera dotado de un alto poder contaminante (demanda bioquímica de oxígeno, D.B.O. 40.000-50.000 mg O₂ l⁻¹), capaz de originar graves problemas de polución en aquellas zonas donde es vertido.

La producción de proteína unicelular de levadura (S.C.P., single-cell protein) mediante fermentación permite eliminar en más de un 90% el poder contaminante del lactosuero, obteniéndose un producto comparable con la levadura de cerveza o la soja, que puede destinarse a la alimentación humana o animal.

Las características referidas anteriormente conducen a una mejora económica del proceso global, en primer lugar por supresión de las sanciones por contaminación del medio ambiente; en segundo lugar, suponiendo una nueva fuente de ingresos a partir de la comercialización del producto.

No basta únicamente que exista un problema de contaminación por vertido al exterior del lactosuero para aconsejar sin más la utilización de un proceso de fermentación en la industria. Es necesario que el proceso de fermentación no sea excesivamente costoso, no suponga una excesiva complejidad, y pueda ser aplicable a distintas escalas o regímenes de producción de lactosuero, variables entre los distintos centros de producción, así como a lo largo de los distintos periodos estacionales. La flexibilidad del procedimiento ha de permitir que el proceso pueda ser aplicable a distintos casos con distintos regímenes de producción.

Para el caso de la existencia de varios centros dispersos de muy bajo volumen de producción el procedimiento propuesto permitiría, en una planta centralizada equidistante a todos ellos sobre la que confluían los volúmenes puntuales, resolver el problema medioambiental aportando una nueva fuente de ingresos.

En plantas de tipo medio (volúmenes de producción < 100.000 l/día) este procedimiento, anexo a la planta, conduciría a una mejor eco-

nomía del proceso global, haciéndolo más impermeable a las fluctuaciones y variabilidad del mercado del sector lechero.

Uno de los objetivos de esta patente es por tanto, permitir la aplicación de la tecnología de fermentación de lactosuero a plantas o grupos de plantas cuyos bajos volúmenes de producción hacen económicamente inviable utilizar otras soluciones.

Se basa en un procedimiento de fermentación poco costoso que puede utilizar distintos volúmenes de producción de lactosuero, en régimen continuo o semicontinuo, sin requerir grandes espacios, y sin alterar significativamente el régimen de trabajo convencional de la quesería.

El procedimiento objeto de esta patente de invención cuyo esquema se presenta en la figura 1 permite procesar el lactosuero en régimen continuo o semicontinuo a una temperatura media de 30°C y pH 3.5. El procedimiento consta de tres etapas diferenciadas:

1) Pretratamiento del lactosuero. Consistente esencialmente de una desproteínización previa (1), seguida de la adición de una serie de nutrientes necesarios para la fermentación (principalmente una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, elementos minerales y vitaminas) (2) los cuales han sido estudiados y fijados sus niveles a fin de obtener un medio de cultivo óptimo para el proceso de fermentación. Así, el aporte de factores de crecimiento y vitaminas, resuelto en otros sistemas a través de la adición de extracto de levadura, de alto costo y causante de la formación de espumas, es sustituido en esta invención por la utilización de un complejo vitamínico de composición y concentraciones previamente optimizadas. De esta manera se consigue un abaratamiento del proceso a la vez que se disminuye la formación de espumas. El medio de fermentación es sometido finalmente a un proceso de pasteurización previo a la fermentación (4).

2) Fermentación. En esta etapa el fermentador de trabajo (12) es inoculado a partir de un cultivo previo (10). El fermentador es aireado continuamente (6) y controladas las variables pH, temperatura y aireación, así como la formación de espumas (7-9), desarrollándose la totalidad de esta etapa en condiciones estériles.

3) Separación/recogida del producto. La levadura rica en proteína es separada del efluente mediante centrifugación en continuo (14). El efluente puede ser vertido con mínimos problemas de contaminación. La crema de levadura es almacenada en tanque(16) hasta ser molida, seada (18) y recogida como producto final (19).

Para controlar el proceso se utiliza un sistema de monitorización y control por ordenador (20), que detecta las alteraciones en las principales variables del proceso (pH, temperatura, espumas, concentración de biomasa y concentración de oxígeno), llamando a los distintos dispositivos, bombas y compresor, al reestablecimiento de las condiciones de operación.

En la figura 1 se presenta el diagrama del proceso completo, con las principales etapas: 1) Pretratamiento (1-4); 2) Fermentación (5-13); 3) Separación/recogida del producto (14-19).

Manera de realizar la invención

La levadura *Kluyveromyces marxianus* (sinónimos: *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus*) NCYC 1424 (National Collection of Yeast Cultures. Inglaterra), es cultivada inicialmente en un fermentador discontinuo (10) a °C y pH 3.5 en el medio que tiene la siguiente composición: urea o sulfato amónico 0.083 mol/l; fosfato diácido de potasio 0.020 mol/l; cloruro de calcio, 1.8 mmol/l; cloruro de sodio, 3.4 mmol/l; sulfato de magnesio, 3.3 mmol/l; cloruro férrico, 3.6 µmol/l; sulfato de zinc, 3.3 µmol/l; sulfato de cobre, 0.7 µmol/l; sulfato de manganeso, 0.4 µmol/l; molibdato sódico, 0.05 µmol/l; ácido nicotínico, 45.5 µmol/l; pantotenato de calcio, 2.8 µmol/l; biotina, 0.16 µmol/l (Castrillo, 1992) hasta alcanzar una concentración de biomasa superior a 10 g l⁻¹. Este cultivo es utilizado como inóculo del fermentador principal (12).

Variante 1. Producción en cultivo continuo. Para la producción en cultivo continuo el procedimiento consta de dos etapas. 1) En una primera etapa semicontinua, a partir del volumen inicial inoculado el lactosuero desproteínizado es adicionado al fermentador (5,12) mediante un programa de dosificación de caudal creciente. El flujo (5) es suministrado de forma que la concentración de lactosa se encuentra a niveles bajos (< 5 g l⁻¹), llevando a la obtención de biomasa con altos rendimientos. La adición de medio al reactor continua hasta alcanzar volumen de proceso. La concentración de biomasa es siempre superior a 10 g l⁻¹. 2) A partir de este punto de fermentador de trabajo (12) opera en régimen continuo, con caudales iguales para las bombas de entrada y salida (5, 13). La velocidad de dilución (relación caudal/volumen del proceso) se fija en un valor en el rango de 0.25 a 0.35 h⁻¹. Los regímenes de aireación se fijan superiores a 0.10 mol O₂ l⁻¹ h⁻¹. El cultivo evoluciona hasta llegar a un estado estacionario con concentración de biomasa superior a 16 g l⁻¹ y rendimiento biomasa/lactosa cercano al 50%. La temperatura y pH se mantiene constante a 30°C y pH 3.5. Para el control de espumas se utiliza un antiespumante reconocido para uso en la industria alimentaria y en proceso de fermentación con levaduras (Dow Corning 1520 (EU)).

Variante 2. Producción en régimen semicontinuo. Para la producción en régimen semicontinuo el procedimiento es igual al anteriormente descrito para la primera etapa de la variante 1. Al cultivo inicial se le añade un caudal controlado de medio mediante la bomba de entrada (5), sin caudal de salida del reactor. El proceso finaliza en el momento que todo el lactosuero ha sido procesado (volumen final igual al volumen total de lactosuero a procesar). La concentración final de biomasa obtenida resulta ser mayor a 16 g l⁻¹. Mismas condiciones de aireación, pH y temperatura que para la variante 1.

La elección del régimen de trabajo, escala y volúmenes es función de los volúmenes de lactosuero a procesar:

La variante 2 consistente en una única etapa

en cultivo semicontínuo resulta aplicable para bajas producciones de lactosuero. El cultivo contínuo permite procesar volúmenes superiores. Por ejemplo, para un cultivo contínuo con velocidad de dilución de 0.25 h^{-1} , volúmenes de reacción de 10.000-15.000 litros permiten proce-

sar volúmenes de lactosuero superiores a 60.000 l/día.

El procedimiento permite en base a su flexibilidad adoptar la solución y escala más adecuada al problema concreto.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Producción de proteína unicelular a partir de lactosuero mediante un pretratamiento del lactosuero en el que se produce una desproteínización, suplementación con nutrientes y pasteurización seguido de una etapa de fermentación y una última fase de separación y recogida del producto **caracterizado** por utilizar en la etapa de fermentación la levadura *Kluyveromyces marxianus* (Sinónimos *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus*), registrada y depositada en la National Collection of Yeast Cultures, Inglaterra, como cepa NCYC 1424, registrada en otras instituciones de depósito de microorganismos a través de su propio código de identificación particular.

2. Producción de proteína unicelular a partir de lactosuero según reivindicación 1 en la que el régimen de operación se lleva a cabo en cultivo

continuo.

3. Producción de proteína unicelular a partir de lactosuero según reivindicación 1 en la que el régimen de operación se lleva a cabo en cultivo semicontinuo, con adición progresiva del lactosuero y sin corriente de salida del fermentador.

4. Producción de proteína unicelular a partir de lactosuero que utiliza, en el proceso de pretratamiento del lactosuero, un medio de cultivo optimizado compuesto de los siguientes componentes y niveles mínimos: urea o sulfato amónico 0.083 mol/l; fosfato diácido de potasio 0.020 mol/l; cloruro de calcio, 1.8 mmol/l; cloruro de sodio, 3,4 mmol/l; sulfato de magnesio, 3.3 mmol/l; cloruro férrico, 3.6 μ mol/l; sulfato de zinc, 3.3 μ mol/l; sulfato de cobre, 0.7 μ mol/l; sulfato de manganeso, 0.4 μ mol/l; molibdato sódico, 0.05 μ mol/l; ácido nicotínico, 45.5 μ mol/l; pantotenato de calcio, 2.8 μ mol/l; biotina, 0.16 μ mol/l (Castrillo, 1992).

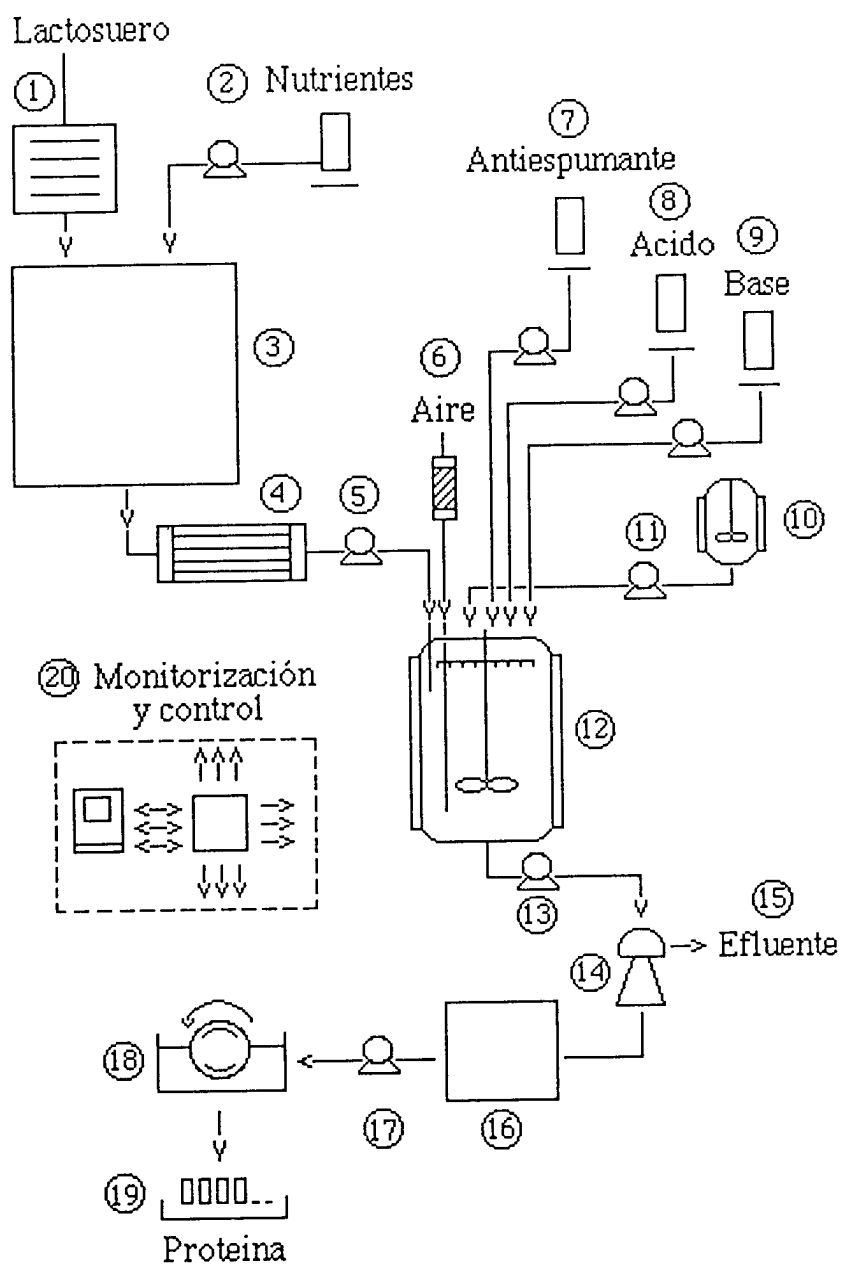


Fig. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 050 066
⑫ N.º solicitud: 9200513
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **06.03.92**
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁵: C12N 1/16, A23J 1/20

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Biotechnology Letters. 1987, vol. 9, n° 11, pp. 795-800. A. Willets et al. "The production of single-cell protein from whey". * Todo el documento *	1
A	FR-A-2319302 (H. Muller)	

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.º:

Fecha de realización del informe
14.01.94

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1