



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 267 196**

(51) Int. Cl.:
C12N 1/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98951376 .7**

(86) Fecha de presentación : **10.09.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1012246**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

(54) Título: **Procedimiento de fermentación con un cultivo de masa continuo de organismos ciliados (protozoos) para la producción de sustancias de valor biogénicas.**

(30) Prioridad: **19.09.1997 DE 197 41 489**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

(73) Titular/es: **Nutrinova Nutrition Specialties & Food
Ingredients GmbH
Industriepark Hochst
65926 Frankfurt am Main, DE**

(72) Inventor/es: **Kiy, Thomas**

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fermentación con un cultivo de masa continuo de organismos ciliados (protozoos) para la producción de sustancias de valor biogénicas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación con un cultivo de masa continuo de ciliados (protozoos) para la producción de sustancias de valor biogénicas en el que la biomasa que contiene las sustancias de valor biogénicas se obtiene mediante extracción celular continua (permanente).

La utilización biotecnológica de los organismos ciliados (una clase de los protozoos) sólo se ha realizado hasta ahora a modo de planteamiento, aunque gran cantidad de productos metabólicos de estos organismos son de interés económico, por ejemplo enzimas lisosomales. Actualmente se describen solamente pocos procedimientos biotecnológicos para la extracción de sustancias de valor biogénico a partir de os organismos ciliados, (predominantemente para el organismo ciliado *Tetrahymena* (Kiy & Tiedtke, 1991, Appl. Microbio Biotechnol., 35, 14; Kiy *et al.*, 1996 Enzyme Technol... 18, 268; Kiy & Tiedtke, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 141)), tratándose aquí exclusivamente de un procedimiento para la extracción de productos celulares excretados, es decir, de productos celulares tales, que se liberan de las células de los organismos ciliados en el medio de cultivo. En esta técnica de procedimiento se cultivan los organismos ciliados en el fermentador y el medio de cultivo que contiene las sustancias de valor biogénicas excretadas, se recoge periódicamente, en un intervalo más o menos regular, y se cambia por un medio nuevo. Durante el intercambio del medio se retienen en el fermentador los organismos ciliados sobre el procedimiento determinado (por ejemplo la utilización de membranas, un inmovilizador de células u otros), de tal modo que no se pierde prácticamente ningún material celular y continúa permanente en principio el cultivo celular.

Para la extracción de las sustancias de valor biogénicas, que se encuentran combinadas en la célula, es sin embargo necesario recoger, el total de las células, la así denominada biomasa. Para este fin normalmente (es decir en el caso del procedimiento de fermentación generalmente conocido con bacterias u hongos como productores de sustancias de valor) se lleva a cabo una así denominada fermentación discontinua, en la que el fermentador se inocula y las células se cultivan, hasta que se obtiene la concentración de producto o la biomasa máxima. Entonces se recoge la biomasa. Procedimientos de este tipo se han descritos ya también para distintos organismos ciliados tales como *Paramecium*, *Colpoda* y *Tetrahymena* (Proper & Garver, 1966, Biotechnol. Bioeng., 8, 287, Schönefeld *et al.*, 1986, J. Protozool., 33, 222; Kiy & Tiedtke, 1992, Appl. Microbiol., 37, 576).

Sin embargo los procedimientos discontinuos de fermentación tienen la desventaja fundamental, de que requieren una depuración en intervalos, nuevas inoculaciones del fermentador y una conservación y mantenimiento intensivo del cultivo celular sobre todo durante la fase de crecimiento crítica).

A partir de la técnica de fermentación con bacterias y levaduras como productores de sustancias de valor se conoce además del procedimiento de fermentación Batch también el "procedimiento de fermentación continuo". En el caso de este procedimiento se cultivan las células en el fermentador hasta una densidad celular determinada y entonces se recolecta permanentemente del fermentador mediante la extracción celular continua mientras simultáneamente se suministra el medio de cultivo nuevo en el mismo volumen. La cantidad de células extraídas por unidad de tiempo (la extracción celular) se mide de tal modo que las células que permanecen en el fermentador condicionadas por el descenso de la densidad celular de la extracción, pueden equilibrarse de nuevo fácilmente mediante la escisión celular continua. En el intervalo de una tasa de extracción celular determinada o tasa de dilución "D" permanece por consiguiente constante la densidad celular en el fermentador, aunque se extraigan continuamente el cultivo y con eso el producto deseado.

En principio este procedimiento de fermentación continuo es desde el punto de vista económico mucho más ventajoso que una fermentación discontinua, pero su realización supone que los organismos cultivados o criados crezcan rápida y regularmente y se multipliquen y que sean insensibles a la fuerza de escisión y de agitación, que actúan en el caso del procedimiento de fermentación continuo.

Por otra parte se conoce que en general los organismos ciliados crecen frecuentemente y se multiplican muy lentamente, que recorren fases de crecimiento diferentes, y que responden de manera muy sensible a la fuerza de escisión y de agitación (Curds & Cockburn. 1971, Journal of General microbiology 66. 95-109; Middler & Finn, 1966, Biotechnology and Bioengineering 8, 71-84). Desde luego que se han descrito ya también ensayos para el cultivo de masa continuo de organismos ciliados, pero solo con el uso de medios de cultivo que contienen bacterias y con resultados para la densidad celular máxima de menos de diez mil células por ml a pesar de 10 días de cultivo e incluso más (Curds & Cockburn, véase anteriormente). Tales densidades celulares son totalmente insuficientes para una aplicación en la medida industrial a escala industrial. Adicionalmente es inadecuado totalmente el cultivo descrito por Curds & Cockburn también por eso para una aplicación a escala industrial, ya que dicta el uso de organismos presa (concretamente medio que contiene bacterias). En el caso de medios de cultivo que contienen bacterias se producen evidentemente también una multiplicación adicional de las bacterias y en realidad dependiendo del volumen total de cuántos organismos ciliados se disponen. El equilibrio de coexistencia entre población de organismos ciliados y la bacteriana es muy inestable, y una acción de error mínimo puede crear alteraciones graves en ambas poblaciones.

El estudio de Curds & Cockburn se remontan a más de 25 años y han apoyado evidentemente la opinión del mundo profesional, que los organismos ciliados no son adecuados para un procedimiento de fermentación continuo en medida a escala industrial.

5 La presente invención encuentra ahora basado en el objeto, de proporcionar un procedimiento para la fermentación continua mediante organismos ciliados con extracción celular, en el que se evitan las desventajas mencionadas y que especialmente es bien adecuado para la aplicación industrial, a escala industrial.

10 Una solución a este objeto se encuentra en proporcionar un procedimiento de la técnica mencionada al principio, en el que se cultivan las células de organismos ciliados en medios axénicos y complejos.

En el sentido de esta invención medio complejo significa una disolución acuosa de medio de nutrición de productos naturales o a partir de los extractos obtenidos para el cultivo de microorganismos.

15 En el sentido de la invención medio axénico significa un medio de nutrición libre de organismos presa y de alimentos (denominado así organismos de nutrición).

20 El procedimiento según la invención se basa en el conocimiento sorprendente de que es realizable un procedimiento de fermentación continuo con extracción celular con el uso de medios axénicos complejos también con cultivos de organismos ciliados puros y excelente rentable científicamente. Son realizables las densidades celulares continuas del orden de magnitud de 1 millón de células por ml sin más, en el caso de *Tetrahymena* lista en el tercer día tras el comienzo del cultivo. Con respecto a esto se supera el prejuicio del mundo profesional, de que no son adecuados los organismos ciliados para un cultivo de masa continuo con densidad celular de desde más de cientos de miles hasta millones de células por ml con la utilización del fermentador conocido en presencia de las fuerzas de escisión que actúan juntas de manera habitual, en el medio axénico (es decir sin organismos presa o alimentos), porque:

- crecen lenta e irregularmente,
- tienen una resistencia pequeña frente a fuerzas de escisión y de agitación y se perjudican o se destruyen mediante 30 tales fuerzas muy fácil y rápidamente, y
- en el caso del ensayo de cultivo a pesar del uso del medio que contiene organismos presa y que con esto se obtiene solamente densidades celulares máximas muy pequeñas proporcionalmente con la oferta de alimento lo más parecido a la naturaleza.

35 Con el procedimiento según la invención es posible por primera vez, utilizar los organismos ciliados para la producción a escala industrial de sustancias de valor biogénicas formadas en la célula y con esto especialmente tales sustancias de valor, que solamente se conocen de organismos ciliados, tales como por ejemplo taurolipidos y tetrahymanol, o que se forman especialmente de organismos ciliados en volumen grande, tales como por ejemplo ácido gamma-linoleico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido octatetraenoico y ácido araquidónico, para obtenerse en volumen de significado científico.

40 Debido a que los ciliados se mantienen como cultivo puro (es decir libre de otros organismos vivos) hay que evitar de entrada factores de perturbación sustanciales, y también el esfuerzo de la técnica se encuentra limitado a una medida mínima: los fermentadores para cultivo posterior de organismos presa son por ejemplo totalmente suprimidos.

45 Entre los productos, que pueden extraerse a partir de la biomasa extraída, se encuentran los péptidos y las proteínas, sobre todo enzimas (por ejemplo β -hexosaminidasa, L-asparaginasa, diisopropilfluorofosfatasa, glucosidasa, fucosidasa, fosfatasa nucleasa o Cathepsin.L), ácidos grasos y lípidos (por ejemplo ácido gamma-linoleico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido octatetraenoico, fosfolípidos, taurolípidos o tetrahymanol), polisacáridos, ácidos nucleicos, metabolitos secundarios, polímeros y otros.

También puede ser como tal producto la biomasa.

55 El grupo de los organismos ciliados que se pueden cultivar por medio de los procedimientos descritos abarcan todos los subgrupos de organismos ciliados taxonómicos, que se dejan cultivar en un principio en cultivos convencionales inmóviles y/o de agitación o por fermentaciones por lotes en medios de alimentación axénicos o medios de alimentación, que contienen como alimento biomasa muerta de un organismo cebador. Estas son en especial la subcategoría de los organismos ciliados *Holotricha*, *Peritricha*, *Spirotricha* y *Suctorina*, y muy especialmente las especies 60 *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpoda*, *Glaucoma*, *Parauronema*, *Engelmanniella*, *Stylonichia*, *Euplotes* y *Colpidium* (clasificación según K. Asuman: Protozoología, editorial Thieme, 1985). La invención no sólo se restringe a las cepas naturales, sino que también incluye cepas de recombinantes y mutantes.

65 En una forma de realización preferida según el procedimiento de la invención se realizó la fermentación en un fermentador de agitación, de columna de burbujas o de aire comprimido.

Durante la fermentación se puede ajustar el pH, preferiblemente en un valor en el intervalo de desde pH 4 hasta pH 9.

ES 2 267 196 T3

La temperatura de fermentación se encuentra según cada especie de organismos ciliados entre 15 y 40°C.

Como fuente de carbono se utiliza preferiblemente al menos una de las sustancias listadas siguientes, a saber: glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, Almidón, fucosa. Glucosalina, lactosa, melaza, dextrano, ácidos oleicos (por ejemplo. ácido oleico), aceite de soja, aceite de girasol, glicerina, ácido glutámico, manitol, leche en polvo desnatada o acetato.

La concentración de la fuente de carbono debe encontrarse entre el 0,2 y el 20% en peso con respecto al medio de cultivo.

Como fuente de nitrógeno se utiliza preferiblemente al menos una de las sustancias siguientes listadas siguientes, a saber: peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, leche en polvo desnatada, ácido casamino, licor macerado de maíz ("corn steep liquor"), fuentes de nitrógeno orgánicas tales como glutamato de sodio y urea, fuentes de nitrógeno inorgánicas como acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio o nitrato de amonio.

La concentración de la fuente de nitrógeno debe encontrarse entre el 0,1 y el 10% en peso con respecto al medio de cultivo.

En una variante del procedimiento según la invención se le añade al medio de cultivo al menos una fuente de fosfatos; fosfato de potasio o dihidrogenofosfato de potasio. Se puede añadir también alternativa o acumulativamente sulfato de amonio, sulfato de sodio, magnesio, hierro, cobre, calcio, vitaminas, elementos traza y factores de crecimiento para seguir optimizando la tasa de crecimiento y la tasa de multiplicación del correspondiente cultivo de organismos ciliados.

La biomasa extraída de manera continua se separa preferiblemente por medio de centrifugación, sedimentación, flotación o separadores. Peor son igualmente posibles otros procedimientos.

En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención se encuentra la tasa de extracción celular o la tasa de dilución D (= volumen reemplazado diariamente/volumen de trabajo del fermentador) en el intervalo de desde 0,1 hasta 12 (= desde 1/19 hasta 12/1) dependiendo de la tasa de crecimiento de la cepa de organismos ciliados.

La invención se explica más detalladamente a partir de los ejemplos de realización.

Ejemplo 1

La fermentación continua de *Tetrahymena piriformis*

Se cultivaron en un fermentador de 2 l del tipo Biostat MD (Braun Biotech, Meslungen) *Tetrahymena piriformis* bajo las siguientes condiciones:

Medio

Agua con aditivos de

- el 0,5% en peso de proteosa-peptona
- el 0,1% en peso de extracto de levadura
- el 3% en peso de azúcar de almidón líquido
- 1 ml/l de traza de hierro

Condiciones de fermentación

- Temperatura: 30°C
- Saturación de oxígeno: 20%
- Ajuste del pH: pH 7
- Comienzo (t_{0h}): inóculo de 50.0000 células/ml; cultivo según la técnica de procedimiento discontinuo
- Comienzo de la fermentación continua: T_{51h} con $D = 1$;
- Prolongación de la fermentación continua: a partir de t_{78h} con $D = 1,5$; a partir de t_{98h} con $D = 2,4$

Al comienzo del cultivo se inoculó el medio con 50.000 de células y este cultivo de inicio se cultivó según la técnica de un procedimiento discontinuo hasta que la población celular se encontraba al final de la fase de multiplicación y

justo antes de entrar en la fase estacionaria. En este momento (en el ejemplo presente 51 horas tras la inoculación (t_{51h})) se pasó a fermentación continua, es decir, a partir de este momento se va extrayendo continuamente medio con contenido celular y se transfiere la correspondiente cantidad de medio libre de células. Al comienzo de la fermentación continuada ascendió la tasa de extracción celular o la tasa de dilución (= cantidad de volumen reemplazado diariamente por volumen de trabajo del fermentador) $D = 1$, es decir, se reemplazó una vez el contenido total del fermentador (2 l) por día y se obtuvieron 2 l de medio que contiene organismos ciliados. Este medio contenía aproximadamente 1 millón de células por ml.

27 horas tras el comienzo de la fermentación continua (= 78 horas tras la inoculación = t_{78h}) se elevó la tasa de extracción celular o la tasa de dilución a $D = 1,5$, es decir, a partir de este momento se obtuvieron 3 l de medio que contiene organismos ciliados por día. A este respecto la densidad celular quedó prácticamente invariable en aproximadamente 1 millón de células por ml. Tras 20 horas adicionales (= 98 tras la inoculación = t_{98h}) se elevó de nuevo la tasa de extracción celular o la tasa de dilución a $D = 2,4$ es decir se obtuvieron aproximadamente 5 l de medio que contiene organismos ciliados por día, manteniéndose la densidad celular prácticamente invariable en aproximadamente 1 millón células/ml.

Los resultados de la fermentación se representan gráficamente en la figura 1. A partir del transcurso de la curva ahí representado es evidente, que a pesar de una tasa de extracción celular constante no se produjo una dilución irreversible, sino que se llevó a cabo una multiplicación continua de los organismos ciliados. Con otras palabras: el cultivo se encontraba en una tasa de extracción celular aun mayor ($D = 2,4$) siempre en un equilibrio dinámico entre extracción celular y multiplicación celular.

Ejemplo 2

Fermentación continua de *Tetrahymena piriformis*

Se cultivaron en un fermentador de 2 l del tipo Biostat MD (Braun Biotech, Meslungen) bajo las siguientes condiciones:

Medio

Agua con aditivos de

- 0,5 g/l de proteosa-peptona
- 1 g/l de extracto de levadura
- 1 ml/l de traza de hierro
- el 1% en peso de glucosa en forma de almidón de azúcar líquido

Condiciones de fermentación

- Temperatura: 30°C
- Saturación de oxígeno: 20%
- Ajuste del pH: pH 7
- Comienzo (t_{0h}): inóculo de 50.0000 células/ml; cultivo según la técnica de procedimiento discontinuo
- Comienzo de la fermentación continua: T_{51h} con $D = 1,2$;
- Prolongación de la fermentación continua: a partir de t_{178h} con $D = 2,4$; a partir de t_{190h} con $D = 3$

Se llevó a cabo el procedimiento en principio tal como el descrito en el ejemplo 1.

En la figura 2 se encuentra representado gráficamente el comportamiento de crecimiento o el de multiplicación de la población de organismos ciliados bajo las condiciones de fermentación mencionadas. A partir del transcurso de la curva representada es detectable que el aumento de la tasa de extracción celular o la tasa de dilución de $D = 1,2$ a $D = 2,4$ (duplicación) condujo a una disminución de la densidad celular de aproximadamente 1 millón de células/ml a aproximadamente 500.000 células/ml (la mitad), que sin embargo entonces se mantuvo esta densidad celular relativamente constante y que no siguió disminuyendo incluso durante el aumento de la tasa de extracción celular o tasa de dilución de $D = 2,4$ a $D = 3$.

ES 2 267 196 T3

Ejemplo 3

Fermentación continua de Tetrahymena piriformis

Medio

Agua con aditivos de

- 20 g/l de leche en polvo desnatada
- 10 g/l de glucosa
- 5 g/l de extracto de levadura
- 1 ml/l de traza de hierro

Condiciones de fermentación

- Temperatura: 30°C
- Saturación de oxígeno: 20%
- Agitador: como 2ª cascada para la regulación de oxígeno
- Ajuste del pH: pH 7
- Comienzo (t_{0h}): inóculo de 50.0000 células/ml; cultivo según la técnica de procedimiento discontinuo
- Comienzo de la fermentación continua: T_{20h} con $D = 1,125$;
- Prolongación de la fermentación continua: a partir de t_{68h} con $D = 1,9$;
a partir de t_{139h} con $D = 4,14$;
- a partir de t_{168h} con $D = 4,4$;

El procedimiento se llevó a cabo en principio tal como el descrito en el ejemplo 1.

En la figura 3 se representa gráficamente el comportamiento de crecimiento o el de multiplicación de la población de organismos ciliados bajo las condiciones de fermentación mencionadas. El transcurso de la curva representada muestra, que al comienzo de la fermentación continua se produjo un descenso de la densidad celular de en un principio aproximadamente 1 millón de células por ml a aproximadamente 600.000 células por ml. Sin embargo la población celular se recuperó de nuevo a pesar del aumento de la tasa de extracción celular o la tasa de dilución al cabo de 1,5 días (aproximadamente 36 horas), y aproximadamente 4 días (90 horas) tras el comienzo de la fermentación continuada había alcanzado de nuevo la densidad inicial de 1 millón de células por ml. Este valor no se rebajó de nuevo incluso durante un aumento continuado de la tasa de extracción celular o de la tasa de dilución $D = 4,1$ y finalmente $D = 4,9$.

En la curva de abajo en la figura 3 se representan los resultados de las determinaciones del peso en seco de las células (en g por l) durante el periodo de cultivación. Del transcurso de la curva que es esencialmente paralelo al transcurso de la curva de multiplicación celular, es detectable que la multiplicación celular no tiene lugar a costa del tamaño celular o del volumen celular, sino que en realidad se ha producido más biomasa.

Ejemplo 4

Fermentación continua de Colpidium campylum

Se cultivó *Colpidium campylum* en un fermentador de 2-l del tipo Biostat MD (Braun Biotech.Melsungen) bajo las condiciones siguientes:

Medio

Agua con aditivos de

- 20 g/l de leche en polvo desnatada
- 10 g/l de glucosa

ES 2 267 196 T3

- 5 g/l de extracto de levadura

- 1 ml/l de traza de hierro

5 *Condiciones de fermentación*

- Temperatura: 25°C

- Saturación de oxígeno: 20%

10

- Agitador: 108 rpm

- Ajuste del pH: pH 7

15

- Comienzo (t_{0h}): inóculo de 50.0000 células/ml; cultivo según la técnica de procedimiento discontinuo

- Comienzo de la fermentación continua: $T_{114,75h}$ con $D = 0,665$;

20

- Prolongación de la fermentación continua: a partir de t_{140h} con $D = 0,632$;

a partir de t_{159h} con $D = 0,462$;

El procedimiento se llevó a cabo en principio tal como el descrito en el ejemplo 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de fermentación con un cultivo de masa continuo de ciliatos (protozoos) para la producción de sustancias de valor biogénicas en el que la biomasa que contiene las sustancias de valor biogénicas se obtiene mediante extracción celular continua, **caracterizado** porque se cultivan las células de los ciliatos en un medio axénico complejo.
- 10 2. Procedimiento de fermentación según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los ciliatos pertenecen a uno de los grupos taxonómicos *Holotricha*, *Peritricha*, *Spirotricha* y *Suctorina*, especialmente las especies *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpoda*, *Glaucoma*, *Parauremonema*, *Engelmanniella*, *Stylonichia*, *Euplotes* y *Colpidium*, comprendiendo además de las cepas salvajes también mutantes y/o recombinantes de estas cepas.
- 15 3. Procedimiento de fermentación según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la fermentación se realiza en un fermentador de agitación, de columna de burbujas o de aire comprimido.
- 20 4. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la fermentación se realiza con un valor de pH en el intervalo de desde pH 4 hasta pH 9 y/o una temperatura de fermentación en el intervalo de aproximadamente desde 15 hasta aproximadamente 40°C.
- 25 5. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el medio contiene una fuente de carbono, que comprende una o varias sustancias del grupo: glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón, fucosa, glucosamina, lactosa, melaza, dextrano, ácidos grasos (por ejemplo ácido oleico), aceite de soja, aceite de girasol, glicerina, ácido glutámico, manitol, leche en polvo desnatada y acetato.
- 30 6. Procedimiento de fermentación según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la concentración de la fuente de carbono asciende a un valor en el intervalo de aproximadamente desde el 0,2 hasta aproximadamente el 20% en peso, con respecto al medio de cultivo.
- 35 7. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el medio contiene una fuente de nitrógeno, que comprende una o varias sustancias del grupo: peptonas, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, leche en polvo desnatada, ácido casamino, licor macerado de maíz ("corn steep liquor"), glutamato de sodio, urea, acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio y nitrato de amonio.
- 40 8. Procedimiento de fermentación según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la concentración de la fuente de nitrógeno asciende a un valor en el intervalo de aproximadamente desde el 0,1 hasta aproximadamente el 10% en peso, con respecto al medio de cultivo.
- 45 9. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el medio contiene al menos una fuente de fosfato, preferiblemente fosfato de potasio y/o dihidrogenofosfato de potasio.
- 50 10. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el medio contiene una o varias de las sustancias siguientes: sulfato de amonio, sulfato de sodio, magnesio, hierro, cobre, calcio, vitaminas, oligoelementos.
- 55 11. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque el medio contiene biomasa muerta de organismos forrajeros de los ciliatos.
- 60 12. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque las células contenidas en el extracto celular (= biomasa recolectada) se separan por medio de centrifugación y/o filtración tangencial y/o microfiltración y/o sedimentación y/o flotación del medio de cultivo.
- 65 13. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la tasa de extracción celular o la tasa de dilución (= volumen reemplazado diariamente/volumen de trabajo del fermentador) asciende a un valor en el intervalo de desde 0,1 hasta 12.
14. Procedimiento de fermentación según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque las sustancias de valor biogénicas son una o varias sustancia(s) del grupo compuesto por: péptidos y proteínas, especialmente enzimas, ácidos grasos y lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, metabolitos secundarios y polímeros, o bien la propia biomasa representa una sustancia de valor (por ejemplo alimento para animales).

Fig. 1

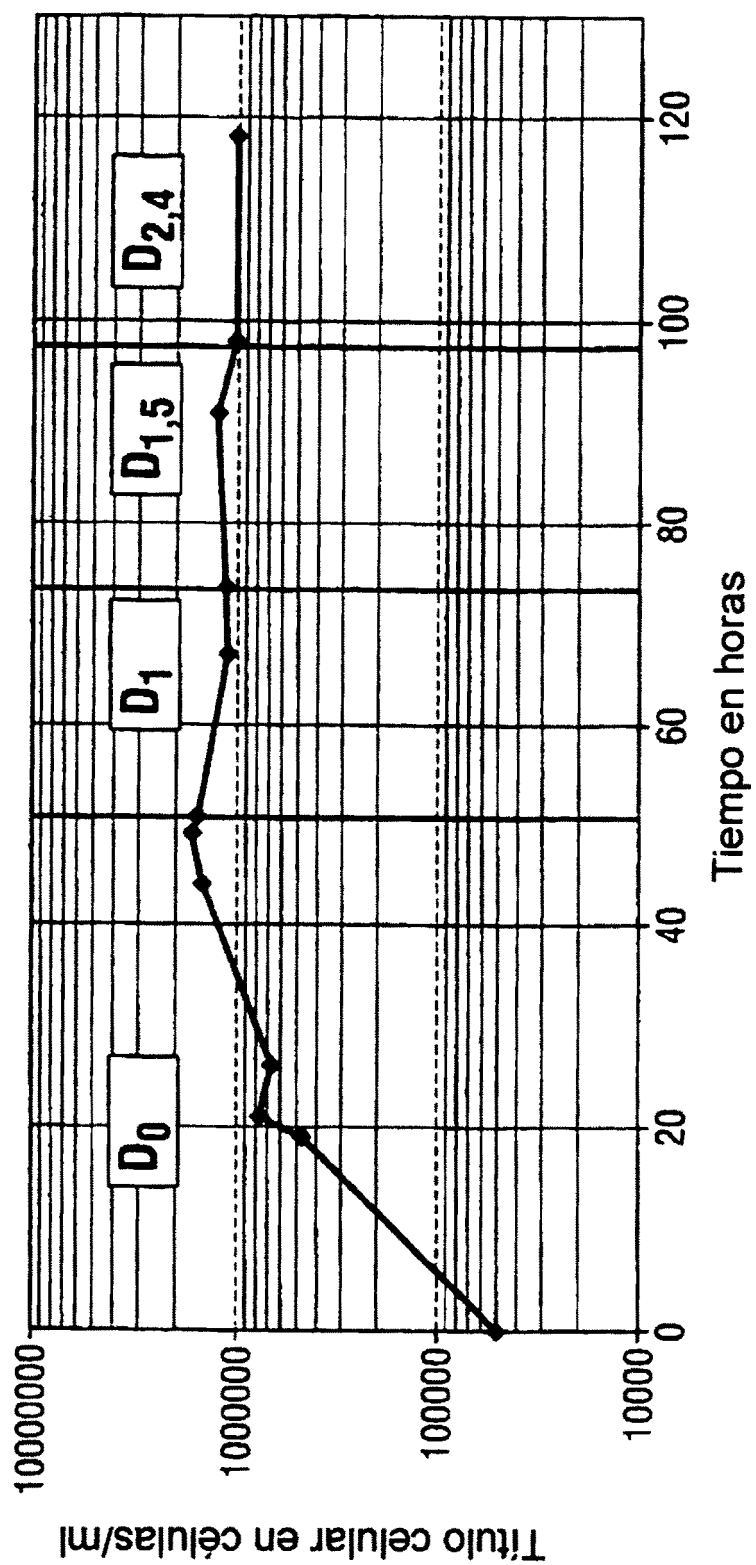


Fig. 2

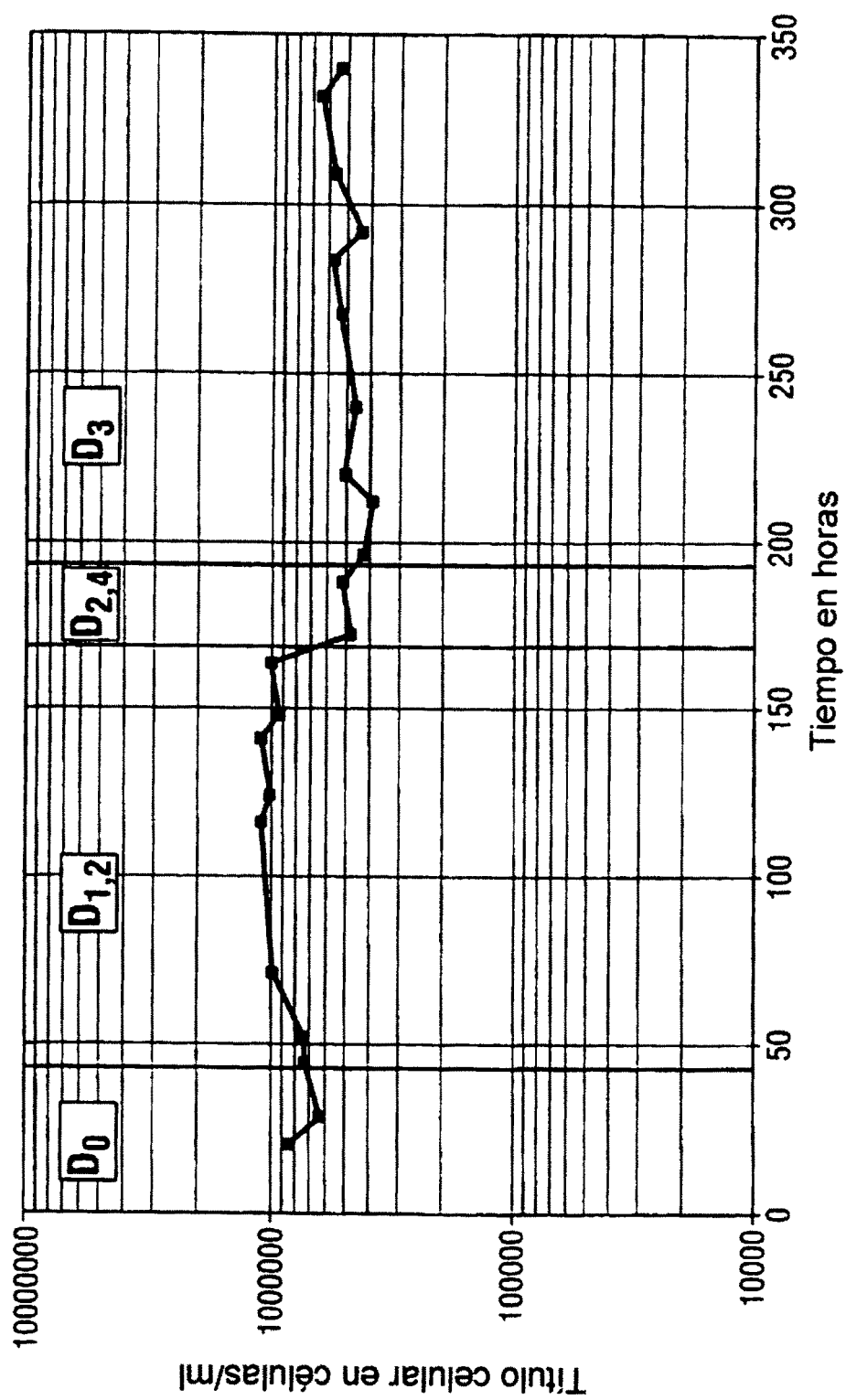


Fig. 3

