



290307

PATENTE DE INTRODUCCION

per 10 años

por "Un procedimiento para la producción de fermentos base" a favor de: **THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED**, de nacionalidad británica, domiciliada en Britannic House, Finsbury Circus, LONDON, E.C.2 (Gran Bretaña).

MEMORIA DESCRIPTIVA

La producción de fermentos base para ganado y a veces para el consumo humano iniciados de carbohidratos (melazas, azúcares de hidrólisis de la madera y lejías de la fabricación del papel) es muy conocida. Los carbohidratos son la única fuente de carbono para el desarrollo del microorganismo empleado.

La substitución de los carbohidratos por hidrocarburos para la producción de fermentos ha sido hasta ahora estudiada solamente en un plano teórico, iniciados de hidrocarburos puros o mezclas de hidrocarburos parafínicos sintéticos, y no se ha considerado el desarrollo de un procedimiento industrial.



El objeto de la patente de introducción es suministrar un procedimiento industrial para la elaboración de fermentos base iniciados de fracciones del petróleo.

5 La presente patente de introducción suministra un procedimiento para la producción de fermentos base que comprende el mantenimiento de un fermento en un medio nutritivo en presencia de una provisión parafínica originaria del petróleo y un gas conteniendo oxígeno libre, preferiblemente aire, bajo condiciones que favorecen el desarrollo del
10 fermento, teniendo dicha provisión un promedio de peso molecular correspondiendo a lo menos 10 átomos de carbono por molécula y separación del fermento del medio acuoso.

El procedimiento puede realizarse de manera continua o a hornadas.

15 Aún cuando la provisión debe ser rica en hidrocarburos parafínicos y es preferiblemente rica en parafinas normales, también puede contener pequeñas cantidades de otros hidrocarburos particularmente naftenos o aromáticos; en general estos hidrocarburos no tomarán parte en
20 el proceso de desarrollo y estarán presentes en el producto. Si se desea, una provisión inicial conteniendo cantidades sustanciales de parafinas junto con otros hidrocarburos puede ser tratada para la separación de una provisión parafínica para emplear en el procedimiento de la patente.
25 Esta puede ser empleada directamente introduciendo fracciones por ejemplo Kerosenos; gas-oils fracciones destiladas medias, preferiblemente las que hierven en el orden de 150-450 grados centígrados. Alternativamente, puede ser empleada tratada a fracciones por ejemplo cera blanda u otras frac-



ciones de cera, por ejemplo como son las derivadas del descerado de fracciones de aceites lubricantes; y parafinas derivadas de procedimientos de separación empleando coladeros moleculares.

5 En general la provisión parafínica no requiere tratamiento especial para adaptarlo al empleo en el procedimiento de la patente y en general puede ser empleadas fracciones de bajo valor como subproductos de operaciones de refinería normal.

10 Preferiblemente el fermento que se desarrolla en la provisión parafínica es de la familia Cryptococcaceae y particularmente de la subfamilia Cryptococcoidae; no obstante si se desea pueden emplearse por ejemplo, fermentos ascomperogeneous de la subfamilia Saccharomyceloidae. El género preferido de la subfamilia Cryptococcoidae es el *Torulopsis* (también conocido como *Torula*) y *Candida*. Los linajes preferidos de *Candida* son el *Candida Tropicalis* y, en particular, el *Candida Lipolytica* (también conocido como *Mycotorula Lipolytica*).

20 Cuando se inicia con un surtido fresco de fermento debe generalmente emplearse el necesario para adaptar el fermento a asimilar el carbono de los hidrocarburos y para emplear una inoculación del fermento adaptado para el procedimiento de desarrollo según la patente. No obstante es-
25 tos fermentos, cuando son cultivados en un medio mineral acuoso conteniendo los apropiados elementos nutritivos se desarrollan con dificultad porque las fracciones de petróleo no contienen los factores de desarrollo que existen en las melazas y azúcares de hidrólisis de la madera, por ejem-

290307



ploteo

5 El desarrollo del fermento empleado es favorecido por la adición al medio de cultivo de una pequeña proporción de extracto de fermento (un producto industrial rico en vitaminas del grupo B obtenido por la hidrólisis de un fermento) o más generalmente de vitaminas del grupo B. Esta cantidad es de preferencia del orden de 25 partes por millón con referencia al medio acuoso de fermentación pudiendo ser elevada o disminuida según las condiciones para el desarrollo escogidas.

10 El desarrollo del fermento se realiza a expensas de la fracción de petróleo con la producción intermedia de cuerpos que tienen una función ácido, principalmente ácidos grasos, de manera tal que el pH del medio mineral acuoso progresivamente disminuye. Si no se corrige el desarrollo es total y rápidamente detenido y la concentración del fermento en el medio, o densidad celular, no extenderá su incremento, de manera que se alcanza una denominada fase estacionaria.

20 Preferiblemente por esta razón el medio nutritivo acuoso es mantenido a un deseado pH por el prudente paso de añadirle continuamente un medio acuoso de elevado valor pH. Evidentemente es necesario evitar perjudicar el fermento con estas adiciones y por esto el empleo de soluciones fuertemente alcalinas deben evitarse y debe usarse vigorosa agitación para dispersar las "bolsas" de elevada alcalinidad en el medio nutritivo. Generalmente, y en particular cuando se emplea el *Candida Lipolytica*, el pH del medio nutritivo debe mantenerse en el orden de 3-6.

290307

27 JUN



y preferiblemente en el orden 3.5-4.5. Materiales alcalinos convenientes para adicionar a la mezcla de desarrollo son el hidróxido sódico, hidróxido potásico y fosfato de hidrógeno disódico.

5 La temperatura óptima de la mezcla de desarrollo variará según el tipo de fermento empleado y debe generalmente hallarse en el orden de 25 a 35 grados centígrados. Cuando se emplea *Candida Lipolytica* la temperatura preferida es del orden de 28-32 grados centígrados.

10 La toma de oxígeno es esencial para el desarrollo del fermento. Con el fin de mantener una rápida proporción de desarrollo el aire, empleado para suministrar oxígeno, debe estar presente en la forma de finas burbujas bajo la acción de excitación. El aire puede ser introducido a través de una
15 superficie. Preferiblemente no obstante se emplea el sistema de aeración íntima conocida como "aeración torbellino". Generalmente debe usarse una pala agitadora operando a cerca las 2000 revoluciones por minuto.

Se ha establecido que con el empleo de fermento del linaje *Candida Lipolytica* en un procedimiento según la pa-
20 ~~deben~~ en el cual la aeración se efectúa por "aeración torbellino", un elevado desarrollo se consigue con un tiempo de generación del orden de 2-5 horas y la concentración de células es incrementada por un factor 12 en dos días.

25 Generalmente será deseable tener presente en la mezcla de desarrollo una pequeña cantidad de un agente antiespumante. En un proceso no continuo o a hornadas es deseable hacer la adición de este agente durante el periodo de desarrollo ya que, en general, los antiespumantes deben ser requeridos sobre to-



290307

do caso si el agente es adicionado en un solo paso.

Convenientemente, agentes antiespumantes silicona se emplearán, por ejemplo en una proporción de 0.1 por cien en peso del medio acuoso.

5 El fermento deberá separarse del medio de desarrollo por unos medios cualesquiera convenientes. Si se desea esto puede lograrse por centrifugación. Es conveniente apartar la mayor parte de cualquier residuo de hidrocarburos retenido en el fermento, lo cual puede realizarse añadiendo a la mezcla de desarrollo, al final del periodo de desarrollo, una pequeña cantidad de un agente activo y, después de centrifugación, tratar el fermento con lavados repetidos de agua y centrifugación. En algunos casos puede ser preferible adicionar el agente activo, en la forma de un agente emulsivo, al principio del periodo de desarrollo.

10

15

El fermento recuperado debe generalmente ser secado para conducirlo a un estado en el cual es biológicamente estable. Métodos convencionales de secado usados en la producción de fermentos horneros pueden ser empleados.

20 Aunque el procedimiento ha sido descrito aquí con referencia particular para operar a hornadas del estado de desarrollo se comprende que una amplia escala de operaciones han de tener una considerable ventaja al ser continuas. En particular, en la operación continua un periodo de inducción al principio del desarrollo puede reducirse o eliminarse.

25 Como previamente se ha establecido la operación del estado de desarrollo bajo condiciones continuas está dentro del objeto del presente procedimiento.

Los siguientes ejemplos ilustran la patente sin limi-

17 J



290307

tar su objeto.

E J E M P L O 1

Preparación del inoculador.

Se inicia con un linaje de *Candida Lipolytica* previamente desarrollada en medio de malta agar que puede primero de todo ser adaptado para asimilar carbono de los hidrocarburos. Para este fin, se hace un cultivo de *Candida Lipolytica* en 250 mililitros de Erlenmeyer estéril en frascos conteniendo 50 mililitros de medio mineral al cual es añadido $\frac{1}{10}$ th mililitros de n-hexadecano. El medium mineral tiene las siguientes composiciones:

Fosfato monopotásico	77 gramos
Sulfato magnésico	0,2 "
Cloruro sódico	0,1 "
Cloruro amónico.	2.5 "
Aguas de escoria (conteniendo trazas de cantidades de elementos minerales).	100 mililitros
Extracto de fermento. " Difco", (Difco es una marca registrada)	1 miligramo
Agua destilada.	Balance al litro

Este cultivo es incubado durante tres días con agitación mecánica a 30 grados centígrados.

5 mililitros de este cultivo son entonces separados y adicionados a otro frasco conteniendo las mismas cantidades del mismo medio mineral y hidrocarburo. La incubación es efectuada durante tres días con agitación. Las mismas operaciones son conducidas durante algún tiempo, por ejemplo, durante cuatro o cinco días. Dos litros de toxina estéril en frascos, conteniendo cada uno un litro del arriba in-

290307



5

dicado medio mineral al cual han sido adicionados 2 mililitros de -n-hexadecano, son germinados con 20 mililitros de una inoculación preparada con el precedente cultivo. Este cultivo es incubado durante 36 horas a 30 grados centígrados con agitación mecánica. Los dos litros de cultivo son centrifugados a 30 grados centígrados y el fermento recobrado constituye el inoculador necesario para emplear en el procedimiento de la patente.

10

Cultivo de *Candida Lipolytica* en un producto de petróleo parafínico.

La provisión de hidrocarburo utilizada es el producto de parafina cruda obtenido por el descerado de un aceite para husos obtenido de un petróleo crudo Kuwait.

Sus propiedades son:

15

Punto de fusión. 42.8 grados centígrados (A.S.T.M. D. 127-60)

Viscosidad cinemática a 100 grados centígrados 3.02 centistokes

Contenido de aceite 17.85 por cien (A.S.T.M. D 721-56TT)

20

Un miligramo por litro de extracto de fermento "Difco" es adicionado al mismo medio nutritivo mineral como se ha descrito antes. El pH es ajustado a 5 al principio del procedimiento. 290 mililitros del medio mineral conteniendo el extracto de fermento son colocados en un vaso de vidrio de un litro equipado con un dispositivo efectivo de inyección de aire. La inyección de aire es puesta en marcha a la proporción de 400 litros por hora y la temperatura es mantenida a 30 grados centígrados, siendo la evaporación compensada por adición periódica de agua destilada.

25

El fermento inoculador es adicionado al vaso y mante-



nido en suspensión, entonces el producto parafínico citado es introducido por sucesivas adiciones de 1 mililitro por hora. Al principio la densidad celular de los fermentos o concentración es 2 gramos por litro expresado en peso seco. Por renovaciones periódicas de 25 mililitros, se mide la evolución de la densidad celular del cultivo. Para este fin, las células fermentos en las muestras tomadas son filtradas y lavadas hasta que los iones amónicos han desaparecido, y secado y entonces su hidrógeno contenido es medido por el método de Kjeldall. Medidos puros y secos el *Candida Lipolytica* previamente apartada indica que su contenido de nitrógeno es 7.25 por cien. Del nitrógeno contenido del ejemplo se puede deducir la densidad celular del cultivo en el momento de la prueba. Se ha establecido que el desarrollo, como expresado por el incremento de la densidad celular, continúa durante cerca 9 horas, al final de las cuales, aparece la fase estacionaria. En este momento, la densidad celular es 3,5 gramos por litro del medio de cultivo. La producción de fermento por litro de medio y por hora es entonces

$$\frac{3.5 - 2}{9} = 0.164 \text{ gramos por litro por hora} = 164 \text{ gramos por metro cuadrado por hora.}$$

E J E M P L O 2

El desarrollo fué efectuado exactamente de la misma manera que en el Ejemplo 1. El cultivo de *Candida Lipolytica* en el principio de la fermentación tenía una densidad celular de 1.60 gramos de fermento por litro de medio en peso seco y un pH de 5. Después de 8 horas, próxima la fase estacionaria y con el pH teniéndolo a 3, el pH fué ajus-



tado a 5 por adición de sosa cáustica lejía. El desarrollo entonces empezó otra vez y continuó durante las siguientes 5 horas hasta que una densidad celular de 6 gramos por litro fué alcanzada.

5 La producción de fermento por litro de medio de cultivo por hora fué

$$\frac{6-1.6}{8-5} = 0.44 \text{ gramos por litro por hora que es, } 440 \text{ gramos por metro cuadrado por hora.}$$

El fermento fué recuperado de la siguiente manera:

10 A cada 1000 partes en peso de la emulsión formada fueron entonces adicionadas 0.25 partes en peso del agente activo catiónico cloruro amónico trimetilo estearílico. El pH fué ajustado a 8 por adición de sosa cáustica lejía y la emulsión centrifugada para dar:

- 15 (a) Una fase pastosa de células fermentos impregnadas con hidrocarburos y con medio acuoso.
(b) una fase clara de medio mineral acuoso
(c) una fase húmeda de hidrocarburos.

20 La fase pastosa conteniendo células fermentos fué lavada con agua conteniendo 0.25 partes por 1000 del mismo agente activo. Dos lavados y centrifugaciones fueron suficientes para obtener fermento fresco de hidrocarburos. Un lavado final con agua pura a 60 grados centígrados fué efectuado para eliminar el agente activo restante en el fermento.

25 El producto obtenido fué calentado a 80 grados centígrados. 90 grados centígrados en una rápida corriente de aire y molido a polvo.

Según otro aspecto del presente procedimiento se su-



ministra un fermento del linaje *Candida Lipolytica* que ha sido adaptado para asimilar carbono de una provisión parafínica del petróleo, teniendo dicha provisión un término medio en peso molecular que corresponde a lo menos a 10 átomos de carbono por molécula.

N O T A

Por la patente de introducción a que se refiere la presente memoria descriptiva se REIVINDICA la explotación exclusiva de:

1.- Un procedimiento para la producción de fermentos base caracterizado por el hecho de que comprende el mantenimiento de un fermento en un medio nutritivo en presencia de una provisión parafínica originaria del petróleo y un gas libre conteniendo oxígeno bajo condiciones que favorecen el desarrollo del fermento, teniendo dicha provisión un promedio de peso molecular que corresponde a lo menos 10 átomos de carbono por molécula, y separación del fermento del medio acuoso.

2.- Un procedimiento tal como el especificado en 1, caracterizado por el hecho de que el fermento es de la familia *Cryptococcaceae*.

3.- Un procedimiento tal como el especificado en 2, caracterizado por el hecho de que el fermento es de la subfamilia *Cryptococcoidae*.

4.- Un procedimiento tal como el especificado en 3, caracterizado por el hecho de que el fermento es del género *Torulopsis*.

5.- Un procedimiento tal como el especificado en 3, caracterizado por el hecho de que el fermento es del gé-



ro Candida.

6.- Un procedimiento tal como el especificado en 5, caracterizado por el hecho de que el fermento es Candida Lipolytica.

5 7.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones caracterizado por el hecho de que el fermento es desarrollado en presencia de un medio nutritivo conteniendo vitaminas del grupo B.

10 8.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones caracterizado por el hecho de que el fermento es desarrollado en presencia de un medio nutritivo conteniendo extracto de fermento.

15 9.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones caracterizado por el hecho de que el pH del medio nutritivo está colocado entre 3.5-4.5.

20 10.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que el pH del medio nutritivo es mantenido durante el desarrollo del fermento al deseado valor por la continua adición de un material acuoso de elevado pH.

25 11.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho de que la aeración del fermento se realiza por aeración torbellino.

12.- Un procedimiento tal como el especificado en

67 JU



- 13 -

290307

una cualquiera de las precedentes reivindicaciones , caracterizado por el hecho de que el medio nutritivo contiene un agente antiespumante.

5

13.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho de que el fermento es separado como una pasta y es después de eso secado.

10

14.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho de que la provisión parafínica es una fracción directa del petróleo.

15

15.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho de que la provisión parafínica es una fracción de cera obtenida por descerado de una fracción de aceite lubricante.

20

16.- Un procedimiento tal como el especificado en 15, caracterizado por el hecho de que la fracción de cera es una cera floja.

25

17.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 14, caracterizado por el hecho de que la provisión parafínica es obtenida de una fracción de petróleo por separación molecular con coladera.

18.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones caracterizado por el hecho de que el gas conteniendo oxígeno es aire.

19.- "Un procedimiento para la producción de fer-



290307

mentos base:

Consta la presente memoria descriptiva de catorce
hojas foliadas, escritas por una sola cara.

Barcelona, 17 de Julio de 1963.

P. p. de: THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED,

J. BONEY DEL RIO
P. P.