

300101

PATENTE DE INVENCION



300101

Memoria Descriptiva

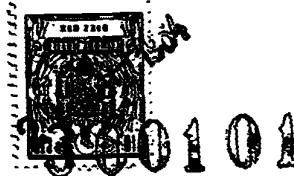
sobre:

"Procedimiento de preparación de un alimento altamente proteínico".

Solicitante: ESSO RESEARCH AND ENGINEERING COMPANY, entidad norteamericana, residente en Elizabeth, New Jersey, EE.UU.de A.

Esta invención se relaciona con perfeccionados y económicos procedimientos de desarrollo de bacterias en alimentos hidrocarbonados económicos, así como la recuperación directa de un excelente suplemento alimenticio de un elevado contenido proteínico, por ejemplo

5.



- del 70 al 75%, para animales y/o seres humanos. Mas particularmente, se relaciona la invención con el suministro continuo de un alimento hidrocarbonoso líquido o gaseoso, un medio salino mineral acuoso líquido y un gas que contiene un exceso de oxígeno a un reactor que contiene dicho alimento, medio acuoso y una bacteria capaz de desarrollarse sobre dichos hidrocarburos, estando dicha bacteria en la fase de desarrollo logarítmico (población que incrementa exponencialmente) y encontrándose presentes en una concentración igual o mayor a aquella para la cual el incremento exponencial en el incremento de población es igual al incremento continuamente retirado; la continua retirada de una porción de la mezcla de reacción a un ritmo tal que se mantenga tiempos críticos de permanencia del líquido; la separación de microorganismos de la mezcla retirada y finalmente el secado de los microorganismos para obtener directamente el deseado suplemento alimenticio bacteriano de elevado contenido proteínico. Mas particularmente aún, en una versión preferida, esta invención se relaciona con el suministro de cantidades críticas del alimento hidrocarbonado basado en el medio salino acuoso. Mas particularmente, en una versión preferida, se relaciona esta invención con la realización de este procedimiento utilizando como alimentación un corte seleccionado de un alimento de petróleo parafínico C_{11} a C_{30} que ha sido purificado para reducir el nivel de aromáticos por debajo del 1/2% en peso, utilizando como bacteria el "Micrococcus cerificans" y utilizando preferiblemente medios de reacción salinos inorgánicos no limitadores óptimos, para obtener
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



una elevada selectividad respecto a la bacteria en lugar de los ésteres subproductos.

Se ha descubierto ahora la posibilidad de preparar económicamente un suplemento alimenticio excelente

5.

de elevado contenido proteínico, a partir de alimentos de petróleo económicos mediante el presente procedimiento crítico. El primer y mas importante requisito de este procedimiento es el uso de tiempos de permanencia del líquido críticamente cortos en el reactor. Se ha

10.

descubierto ahora sorprendentemente que utilizando tiempos de permanencia del líquido de 1,5 a 4 veces, y preferiblemente de 2 a 3 veces, el tiempo mínimo de generación para el organismo particular, por ejemplo el *Micrococcus cerificans*, se produce una gran desviación

15.

en la selectividad respecto a la bacteria, como sigue:

1. 2,7 veces el tiempo mínimo de generación:

35 kg de n-parafina + 40,370 kg O₂ + 9,979 kg de sales inorgánicas, NH₃, etc., --> 45,36 kg de células secas + 28,123 kg de CO₂ + 11,796 kg de H₂O.

20.

2. 5,3 veces el tiempo mínimo de generación:

40,370 kg de n-parafina + 57,61 kg de O₂ + 9,979 kg de sales inorgánicas, NH₃, etc. --> 45,36 kg de células secas mas 43,998 kg de CO₂ + 18,597 kg de H₂O.

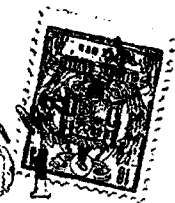
25.

El "tiempo mínimo de generación", tal como se emplea en esta descripción, se define como el tiempo mínimo para que se produzca la duplicación de la concentración de bacterias en la fase logarítmica (es decir línea recta sobre un trazado logarítmico) de la

30.

fermentación de la carga realizada bajo condiciones óp-

300101



timas, es decir, temperatura, pH y suministro no limitador (incluyendo el uso de un exceso de agitación) de hidrocarburo, O_2 y medio salino acuoso óptimo para la bacteria. Si se emplea un promotor del desarrollo en el procedimiento continuo, el "tiempo de generación mínimo" a que se hace referencia anteriormente deberá incluir el suministro de dicho promotor. Este tiempo mínimo de generación para la bacteria particular puede determinarse según la literatura o determinarse convenientemente de modo empírico en el laboratorio, usando preferiblemente un fermentador de cargas agitado con una pala a 1.500 r.p.m.

5.

10.

15.

20.

25.

30.

Respecto a la sorprendente naturaleza de la mejora obtenida limitando el tiempo de permanencia del líquido, no cabe esperar que unos cortos tiempos de permanencia mejoren la selectividad ni que un experto en el arte intente ordinariamente usar tales tiempos de permanencia cortos del líquido en ausencia de la mejora de selectividad actualmente descubierta. Así, (t) es teóricamente imposible usar en un procedimiento continuo tiempos de permanencia del líquido inferiores a 1,45 veces el tiempo mínimo de generación, es decir en cualquier reacción en la que el ritmo de formación del producto sea proporcional a la cantidad de producto presente, el tiempo mínimo de permanencia para un procedimiento continuo es $\frac{1}{\log_{\text{natural}} 2}$ ó 1,45 veces el tiempo mínimo de generación de la carga; y (t) como el procedimiento continuo está sujeto a desórdenes y considerables variaciones respecto a las condiciones óptimas, habrá de aplicarse un margen de seguridad de t por lo



300101

- menos, y preferiblemente 2 veces, el tiempo mínimo de permanencia para un procedimiento continuo (concretamente, 1,45 veces el tiempo mínimo de generación) para evitar el agotamiento de la población de bacterias, es decir su desaparición del reactor. Es de destacar que el único coste para este factor de seguridad es el incremento de tamaño del reactor y que esto constituye un costo menor en el costo total del procedimiento.
- 5.
10. Cabe destacar que no debe esperarse que unos cortos tiempos de permanencia mejoren apreciablemente la selectividad y que las ventajas comerciales obtenidas utilizando cortos tiempos de permanencia del líquido son extremadamente grandes, como seguidamente se expone:
15. 1. Costos de refrigeración.- Todos los procedimientos de desarrollo bacteriano son altamente exotérmicos, por ejemplo de 2520 a 5040 Cal/kg de células y se realizan a temperaturas próximas a la temperatura ambiente. Por consiguiente, se requiere ordinariamente refrigeración en lugar de enfriamiento con agua. El costo de esta refrigeración en un procedimiento típico en el que se utiliza un corto tiempo de permanencia (ecuación 1) es aproximadamente el 40% de los costos asociados a la fermentación (es decir los costos totales compuestos por los de la materia prima mas los de la fermentación, mas los de recuperación del producto). Con mayores tiempos de permanencia (ecuación 2) este costo se incrementa aproximadamente en un 60%, es decir proporcional a la cantidad adicional de oxí-
- 20.
- 25.
- 30.



3 101

geno utilizada para formar CO_2 y agua.

5. 2. Costos de energía.- Todos los actuales procedimientos de desarrollo bacteriano implican hidrocarburos disueltos en baja concentración en un medio de desarrollo salino mineral acuoso. Como el oxígeno tiene una solubilidad muy baja en agua, se requieren grandes cantidades de energía (agitación y ventiladores) para obtener la transferencia de oxígeno al microorganismo. Estos requisitos de energía no se reducen por recursos tales como el emulsionamiento, aunque pueden ser reducidos usando aire enriquecido en oxígeno en lugar del propio aire. Sin embargo, el costo de proporcionar aire enriquecido en oxígeno es muy considerable. En cualquier caso, utilizando cortos tiempos de permanencia (ecuación 1), los costos de energía representan aproximadamente el 40% de los costos de fermentación y estos costos se incrementarían aproximadamente en un 40% ó más utilizando mayores tiempos de permanencia, (ecuación 2).

10. 3. Costos de hidrocarburos.- Los costos de hidrocarburos se reducen naturalmente en un 15% utilizando cortos tiempos de reacción. Sin embargo, estos costos son pequeños en comparación con aquellos a los que se hace referencia anteriormente.

15. 4. Costos de equipo reactor.- El tamaño del reactor se reduce también en un 15% utilizando cortos tiempos de reacción. Sin embargo esta mejora de costo es también pequeña en comparación con los puntos 1 y 2 anteriores.

20. 30. Con relación a una versión preferida, la de em-

30013



- plear como alimentación un alimento hidrocarbonoso C_6 a C_{30} , se ha descubierto ahora que la purificación de esta alimentación para excluir esencialmente todos los aromáticos es áltamente deseable o necesaria. Se ha descubierta ahora sorprendentemente que los materiales aromáticos tanto monocíclicos como policíclicos normalmente presentes en las alimentaciones de petróleo no son utilizados por muchas bacterias, y sin embargo estos aromáticos son adsorbidos sobre o en el interior de la bacteria aún cuando los ésteres subproductos y aceite sin convertir sean reducidos al mínimo por los presentes procedimientos preferidos. Así, estos materiales son difíciles de separar; por ejemplo, unos intensos ensayos de alimentación animal muestran que unos niveles de cualesquiera aromáticos policíclicos o monocíclicos, en los alimentos para animales por encima del 0,05% en peso disminuyen grandemente el desarrollo animal. Así,, aún cuando se separen posibles aromáticos heterocíclicos carcinógenos, los aromáticos monocíclicos serían extremadamente perniciosos para el desarrollo animal. El presente procedimiento, por eliminación esencialmente de todos los aromáticos del alimento, permite una recuperación extremadamente económica de las bacterias, puesto que se ha observado ahora que el alimento hidrocarbonado residual sin convertir y los ésteres productos, etc., retenidos en las bacterias, no contaminan o perjudican de otro modo el desarrollo animal. Estos productos retenidos en las bacterias no son sin embargo ventajosos por lo que intencionadamente se les reduce al mínimo mediante las técnicas preferidas
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

300101 2



actualmente descubiertas y que mas adelante se describen.

5. Así, se ha descubierto que dotando de grandes cantidades de aire, del orden de 0,5 a 4,0 y preferiblemente de 0,8 a 2,5 volúmenes del mismo al reactor por volumen de líquido en el reactor por minuto por porcentaje en peso de concentración bacteriana en seco en el reactor por tiempo de permanencia del líquido en horas, se obtiene una perfeccionada selectividad. En una
10. versión variante, se emplea aire enriquecido en oxígeno. Con este material, se reduce proporcionalmente el suministro de la cantidad requerida, puesto que se incrementa el contenido en oxígeno. En esta versión, el aire enriquecido tiene más del 70% y mas preferiblemente aún más del 90% en oxígeno, debido a la economía proporcionada por los reducidos costos de compresor. Así
15. se ^{produce} reduce la conversión inicial del oxígeno presente en ácidos grasos, cuyos ácidos utilizan luego las bacterias para su desarrollo, produciendo CO₂ y agua como subproductos de los mismos. En ausencia de suficiente aire
20. continúa la reacción inicial de producción de ácidos, pero hay un aire insuficiente para que las bacterias utilicen los ácidos para su desarrollo, convirtiendose en ésteres, que se acumulan en las células.
25. En otra versión preferida, se ha descubierto que utilizando aire enriquecido en oxígeno, pueden emplearse niveles muy elevados de hidrocarburos, por ejemplo superiores al 2% en peso sobre el medio acuoso salino inorgánico (incluyendo NH₄OH) suministrado, y al mismo
30. tiempo puede obtenerse una completa utilización del hi-



300101

- drocarburo, es decir retirándose continuamente unos bajos niveles de hidrocarburo en la mezcla en equilibrio. Además, sorprendentemente la elevada selectividad respecto a bacterias frente a ésteres del presente procedimiento se conserva incluso con estos elevados niveles de hidrocarburo. Unos niveles preferidos son del 1 al 5 y más preferiblemente del 1 al 3% en peso, basado en el medio acuoso salino inorgánico cuando se usa aire enriquecido en oxígeno.
- 5.
10. Finalmente, utilizando específicamente un medio de desarrollo acuoso preferido, que contenga una combinación crítica de sales inorgánicas se incrementan grandemente las selectividades, de manera que se obtiene una disminución décuple en ésteres, es decir la mezcla en equilibrio después del secado contiene un 2% de ésteres respecto a las bacterias, frente al 20% obtenido con solo una ligera variación en el medio de reacción de sales minerales.
- 15.
20. Todo lo que antecede, considerado de modo combinado, disminuye grandemente los costos de producción de los alimentos para animales a partir de hidrocarburos. Así, por ejemplo, las necesidades de energía para agitar el reactor y suministrar aire, son grandemente reducidas, además de la enorme mejora obtenida al poder separar las bacterias mediante un simple procedimiento que no requiere unas operaciones de purificación extremadamente costosas, por ejemplo un lavado repetido con surfactantes, extracción, etc.
- 25.
30. Finalmente, es preferible usar coagulantes, por ejemplo surfactantes catiónicos, para disminuir la se-



paración inicial, por ejemplo los costos de centrifugación o sedimentación.

- La presente invención se comprenderá más claramente considerando el adjunto dibujo, que ilustra un
5. aparato preferido para realizar de modo continuo la presente invención utilizando una alimentación preferida C_6-C_{30} que contenga aromáticos. Con referencia al dibujo, la alimentación hidrocarbonada se introduce por el conducto 1 a la purificación del mismo 2, de don
10. de se retiran los materiales anormales y las impurezas a través del conducto 3. Esta purificación del alimento consiste preferiblemente en una absorción de los hidrocarburos normales, preferiblemente parafinas, mediante cribas moleculares 5A seguido de desorción y luego
15. de una limpieza de los hidrocarburos normales desorbidos con cribas 13X 6 gel de sílice para absorber las restantes impurezas, incluyendo a los aromáticos. Las parafinas normales purificadas se pasan a través del conducto 4 al depósito 5 de parafina normal. Las parafinas normales son suministradas a través del conducto
- 20 6 al reactor 7 que contiene a las bacterias y son agitadas por un agitador 8. Se suministra ácido fosfórico a través del conducto 9, se suministran sales inorgánicas a través del conducto 10 y agua a través del
25. conducto 11 al depósito de mezclado 12 equipado con un agitador 13. La solución salina mezclada se suministra a través del conducto 14 al reactor. También se suministra hidróxido amónico al reactor a través del conducto 15. Se suministra aire o aire enriquecido al
30. reactor a través del conducto 16. Se ventilan a la at-



- mósfera desde el reactor a través del conducto 17, aire, CO₂ y vapores de agua. Se retira continuamente a través del conducto 18 una mezcla de células de producto, solución salina y pequeñas cantidades de hidrocarburo sin reaccionar, y una parte de esta mezcla es recirculada a través del conducto 19, torre de refrigeración 20 y conducto 21, para proporcionar una refrigeración al reactor. Adicionalmente o como variante, puede emplearse también en el reactor un serpentín de refrigeración 22.
5. El resto de la mezcla-producto es suministrado a través del conducto 23 a centrifugadoras o sedimentador 24, donde se separa las células de producto. El líquido sobrenadante es retirado a través del conducto 25 y recirculado al reactor. Las células concentradas separadas se pasan a través del conducto 26 a los secadores 27, que serán preferiblemente secadores por pulverización, utilizando aire caliente suministro a través del conducto 28. Las células secas de producto se retiran a través del conducto 29. Preferiblemente, la separación centrífuga es tal que el porcentaje en peso de células secas (sin incluir el agua intercelular) en la pasta de la centrifugadora sea del 7 al 28% en peso y mas preferiblemente del 10 al 15% en peso. Tal separación puede efectuarse económicamente y debido a las críticas condiciones de la reacción, las células del producto final contendrán después del secado sólomente del 7 al 10% en peso de grasa total, de la cual el 75% aproximadamente está constituido por ésteres y el 5 al 9% en peso por sales inorgánicas. Así, las pérdidas de estas últimas que no son particularmente ventajosas en el alimento.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



300101

- animal, no son excesivas. Se destaca que en lugar de la separación centrífuga, pueden emplearse otros métodos tales como la filtración o sedimentación, con o sin auxiliares filtrantes o coagulantes, para efectuar la separación inicial de las células, pudiéndose usar naturalmente varios procedimientos de secado. En cualquier caso, es de destacar que este procedimiento es extremadamente económico, en el sentido de que no se requieren ninguna separación completa especial ni lavado de surfactantes para separar aceite y subproductos (aunque pueden emplearse en aspectos mas amplios de esta invención) para obtener un producto final de un contenido en proteínas extremadamente elevado y sin impurezas nocivas para los animales o seres humanos.
5. De acuerdo con la presente invención, los alimentos para el presente procedimiento son alimentos de petróleo de C₁-C₃₀, preferiblemente aceites gaseosos que hiervan entre 190 y 400°C, y preferiblemente entre 190 y 320°C. Otros alimentos preferidos son C₁-C₃₀ normales e isoparafinas, cicloparafinas, monocicloparafinas, diolefinas y aromáticos y mezclas de ellos. Particularmente preferidas son las parafinas normales. Alimentos disponibles en grandes cantidades y particularmente adecuados, son las parafinas normales C₁₁-C₃₀ de gasoils, naftas ligeros y alimentos normalmente gaseosos tales como metano, etano y propano y mezclas de ellos, tales como gas natural. Cuando se emplean alimentos normalmente gaseosos, se suministran naturalmente de modo preferido como gases directamente al reactor a través de rociadores.
10. De acuerdo con la presente invención, los alimentos para el presente procedimiento son alimentos de petróleo de C₁-C₃₀, preferiblemente aceites gaseosos que hiervan entre 190 y 400°C, y preferiblemente entre 190 y 320°C. Otros alimentos preferidos son C₁-C₃₀ normales e isoparafinas, cicloparafinas, monocicloparafinas, diolefinas y aromáticos y mezclas de ellos. Particularmente preferidas son las parafinas normales. Alimentos disponibles en grandes cantidades y particularmente adecuados, son las parafinas normales C₁₁-C₃₀ de gasoils, naftas ligeros y alimentos normalmente gaseosos tales como metano, etano y propano y mezclas de ellos, tales como gas natural. Cuando se emplean alimentos normalmente gaseosos, se suministran naturalmente de modo preferido como gases directamente al reactor a través de rociadores.
15. De acuerdo con la presente invención, los alimentos para el presente procedimiento son alimentos de petróleo de C₁-C₃₀, preferiblemente aceites gaseosos que hiervan entre 190 y 400°C, y preferiblemente entre 190 y 320°C. Otros alimentos preferidos son C₁-C₃₀ normales e isoparafinas, cicloparafinas, monocicloparafinas, diolefinas y aromáticos y mezclas de ellos. Particularmente preferidas son las parafinas normales. Alimentos disponibles en grandes cantidades y particularmente adecuados, son las parafinas normales C₁₁-C₃₀ de gasoils, naftas ligeros y alimentos normalmente gaseosos tales como metano, etano y propano y mezclas de ellos, tales como gas natural. Cuando se emplean alimentos normalmente gaseosos, se suministran naturalmente de modo preferido como gases directamente al reactor a través de rociadores.
20. De acuerdo con la presente invención, los alimentos para el presente procedimiento son alimentos de petróleo de C₁-C₃₀, preferiblemente aceites gaseosos que hiervan entre 190 y 400°C, y preferiblemente entre 190 y 320°C. Otros alimentos preferidos son C₁-C₃₀ normales e isoparafinas, cicloparafinas, monocicloparafinas, diolefinas y aromáticos y mezclas de ellos. Particularmente preferidas son las parafinas normales. Alimentos disponibles en grandes cantidades y particularmente adecuados, son las parafinas normales C₁₁-C₃₀ de gasoils, naftas ligeros y alimentos normalmente gaseosos tales como metano, etano y propano y mezclas de ellos, tales como gas natural. Cuando se emplean alimentos normalmente gaseosos, se suministran naturalmente de modo preferido como gases directamente al reactor a través de rociadores.
25. De acuerdo con la presente invención, los alimentos para el presente procedimiento son alimentos de petróleo de C₁-C₃₀, preferiblemente aceites gaseosos que hiervan entre 190 y 400°C, y preferiblemente entre 190 y 320°C. Otros alimentos preferidos son C₁-C₃₀ normales e isoparafinas, cicloparafinas, monocicloparafinas, diolefinas y aromáticos y mezclas de ellos. Particularmente preferidas son las parafinas normales. Alimentos disponibles en grandes cantidades y particularmente adecuados, son las parafinas normales C₁₁-C₃₀ de gasoils, naftas ligeros y alimentos normalmente gaseosos tales como metano, etano y propano y mezclas de ellos, tales como gas natural. Cuando se emplean alimentos normalmente gaseosos, se suministran naturalmente de modo preferido como gases directamente al reactor a través de rociadores.
30. De acuerdo con la presente invención, los alimentos para el presente procedimiento son alimentos de petróleo de C₁-C₃₀, preferiblemente aceites gaseosos que hiervan entre 190 y 400°C, y preferiblemente entre 190 y 320°C. Otros alimentos preferidos son C₁-C₃₀ normales e isoparafinas, cicloparafinas, monocicloparafinas, diolefinas y aromáticos y mezclas de ellos. Particularmente preferidas son las parafinas normales. Alimentos disponibles en grandes cantidades y particularmente adecuados, son las parafinas normales C₁₁-C₃₀ de gasoils, naftas ligeros y alimentos normalmente gaseosos tales como metano, etano y propano y mezclas de ellos, tales como gas natural. Cuando se emplean alimentos normalmente gaseosos, se suministran naturalmente de modo preferido como gases directamente al reactor a través de rociadores.



300101

- Para el éxito de esta invención en su versión más preferida, es crítica una purificación de cualquier alimento C_6-C_{30} para reducir el nivel de aromáticos tanto policíclicos como monocíclicos por debajo del 0,5 % en peso, preferiblemente por debajo del 0,1 % en peso, preferiblemente por debajo de 100 ppm. Esto es necesario porque se ha descubierto ahora sorprendentemente que los aromáticos no son atacados por los microorganismos y cuando se emplean los económicos procedimientos de separación de esta invención sin tal purificación del alimento, el producto es extremadamente nocivo para los animales y personas. Por nocivo, se entiende que estos materiales disminuyen el ritmo de desarrollo de los animales con tales alimentos. Esto es completamente independiente de las pequeñas cantidades de aromáticos policíclicos que se consideran carcinógenas y que se mantienen preferiblemente fuera del producto final. Estos últimos materiales pueden separarse de la alimentación selectivamente por varios procedimientos, pero es sorprendente que la cantidad de aromático monocíclico que constituye una parte notable del total de aromáticos, es decir del 20 al 50%, ha de eliminarse también a fin de permitir que el presente procedimiento resulte útil. Es de destacar que una serie de otros procedimientos descritos en la literatura como comerciales o potencialmente comerciales sugieren un lavado de surfactantes extremadamente costosos, extracción y otros procedimientos empleados sobre el producto a fin de obtener un buen material alimenticio para los animales.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



El preferido procedimiento de purificación del hidrocarburo, preferiblemente un alimento de gas-oil, es un procedimiento de criba molecular. Este procedimiento absorbe selectivamente los hidrocarburos de cadena recta sobre la criba molecular y los purifica así de modo substancialmente completo de los aromáticos.

5.

Un método preferido de realización de esta purificación del procedimiento con gas-oils se describe en la patente estadounidense número 3.070.542 y la descripción de esta patente se incorpora aquí por referencia como técnica preferida para purificar los alimentos de la presente invención. La esencia de esta patente es el descubrimiento de que precargando la criba molecular con el medio desplazador, preferiblemente amoniaco, e introduciendo el medio desplazador junto con el alimento, se incrementa el ritmo de absorción y se facilita grandemente la subsiguiente disorción particularmente con materiales de elevado peso molecular. Es también preferible usar una operación adicional de limpieza, como se describe en las patentes belgas números 637.262 ó 637.315, cuyas descripciones se incorporan también aquí por referencia. Adecuadas bacterias para su empleo en el presente procedimiento son cualesquiera que se desarrollen sobre hidrocarburos y que no sean tóxicas para los animales, seleccionadas de la clase esquizonictos y que incluye las siguientes subclases:

10.

15.

20.

25.

30.

- I Pseudomonadales
- II Clamidrobacteriales
- III Hipomicrobiales
- IV Eubacteriales



- V Actinomicetales
- VI Cariofoniales
- VII Beggiatoales
- VIII Mixobacteriales
- 5. IX Spirocetales
- X Micoplasmatales

Preferidas bacterias para su empleo en la presente invención son las siguientes:

10. *Micrococcus cerificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rubra*, *Nocardia coralina*, *Pseudomonas Methanica*, *Pseudomonas desmolyticum*, *Mycobacterium phleie*. Especialmente preferido es el *Micrococcus cerificans*, aislado e identificado por el Doctor R. E. Kalle y colaboradores,
15. *Journal of Bacteriology*, volumen 78 número 3, pp. 441-448 (septiembre de 1959). Se han depositado cultivos de este organismo en la American Type Culture Collection, 212 M Street, N. W., Washington 7, D.C., como número 14987. La completa identificación de este material es
20. como sigue:
- Morfología: Las células son pequeñas, esféricas, tendentes a ser elipsoidales en cultivos antiguos y en medios de elevado contenido en nitrógeno. Las células de los medios definidos tienen un diámetro medio de
25. 0,5 a 1,0 micra, las de medios complejos tienen unos diámetros de 1,0 a 2,0 micras. Las células se producen aisladamente o en colonias. No se observan gránulos in móviles, gránulos metacromáticos ni gránulos sudanofílicos.
30. Reacción Gram: Negativa.

300101²



Las colonias en agar definido son pequeñas (aun milímetro), circulares, convexas y con borde entero. Las colonias sobre agar nutrientes son mayores (2 a 5 mm), mucoides desarrolladas y generalmente redondas.

5. Pigmentación: Se producen variantes blanca, beis o canela.

Obligadamente aeróbicas. Una amplia variedad de materiales sostiene al extracto de levadura de desarrollo, hidrolizado caseínico, alcoholes y ácidos de cadena larga, alcanos normales de cadena larga y olefinas.

10. Fermentación de hidratos de carbono: No se fermenta ningún hidrato de carbono. Aeróbicamente, muchos hidratos de carbono son asimilados. Estos incluyen a la glucosa, maltosa, manitol, sacarosa, lactosa, arabinosa, ramnosa, sorbitol, dulcitol e inulina. Aeróbicamente, se utiliza la glucosa con producción de ácido. Se ha identificado el ácido glucónico.

Reducción con nitrato: Negativa.

Licucción de gelatina: Generalmente negativa.

20. Puede ocurrir una lenta licucción en algunas razas.

Hidrólisis de urea: Negativa.

Se produce catalasa.

No se utiliza hidrógeno.

La temperatura óptima es 25°C.

25. El pH óptimo para el desarrollo es de 7,0 a 8,5.

Fuente: Tierra de Iowa.

Habitáculo: Tierras

30. Es de destacar que una identificación más reciente llevada a cabo en los laboratorios de estos inventores, muestra que el organismo es probablemente un



artrobacteria en lugar de un micrococcus y se asemeja estrechamente al *Arthrobacter ureafacenes*. El siguiente resumen de productos indica las razones por las cuales este organismo se identifica preferiblemente como una artrobacteria:

5.

| <u>Micrococcus</u> | <u>"M. Carificans"</u> | <u>Artrobacteria</u> |
|--|------------------------|--|
| Siempre grampositivo al principio de la fermentación | Siempre gramnegativo | Gramnegativa o variable |
| Células en masas irregulares | Como la artrobacteria | Puede producirse una formación de filamentos cortos con gemación rudimentaria (alguna) |
| Nunca cambia de tamaño | " | <u>A veces pueden aparecer células cocoidales mayores que de ordinario</u> |
| Nunca se produce en un estado de barra | " | Células cocoidales grandes dan lugar a células en forma de barras |
| Hidratos de carbono frecuentemente fermentados | " | Poco o ningún ácido de hidratos de carbono. |

Como anteriormente se indica, se introduce aire continuamente en el cultivo, preferiblemente por el fondo del recipiente de fermentación a través de un rociador u otro dispositivo mecánico para desintegrar el aire en finas burbujas. Como anteriormente se describe, el reactor se agita preferiblemente mediante un agitador de pala u otro medio para distribuir por completo el oxígeno por todo el medio de cultivo reactivo. Por ejemplo, puede emplearse un agitador o agitadores de palas que tengan un valor en caballos de 1 a 100 y

10.

15.



0101

- preferiblemente de 5 a 30 por 4546 litros de medio de cultivo reactivo líquido. Los niveles de agitación preferidos con un agitador de pala son superiores a 1.000 r.p.m. y preferiblemente superiores a 1.500. Preferiblemente, se empleará una aireación en torbellino, es decir con el uso de un cilindro vertical extendido desde justamente por debajo de la superficie del líquido hasta cerca del fondo del recipiente, para obtener un mejor mezclado y retirar la espuma formada en la fermentación de la superficie del líquido y distribuirla a través del tubo hasta el fondo del recipiente.
- 5.
- 10.

- La fuente de nitrógeno puede ser un derivado nitrogenado orgánico o inorgánico. En la categoría orgánica, pueden mencionarse las proteínas, proteínas hidrolizadas ácidas, proteínas digeridas con enzimas, aminoácidos, extractos de levadura, asparraguina y urea. Por razones de economía, es generalmente preferible emplear un compuesto inorgánico tal como amoníaco, hidróxido amónico o sales del mismo, tales como fosfato amónico, citrato amónico, etc. Un método muy conveniente de suministrar nitrógeno consiste en añadir hidróxido amónico. De esta manera se proporciona el valor de pH de 5,5 a 7,5 y el nitrógeno requerido. Para este fin, también puede burbujearse gas de amoníaco directamente en el cultivo. Como variante, puede añadirse ácido o base adicional si fuese necesario de vez en cuando, por ejemplo SO_4H_2 . Es de destacar que el presente procedimiento no requiere ningún costoso estimulante de desarrollo, tal como vitaminas, etc.
- 15.
- 20.
- 25.

30. Además de las fuentes de energía y nitrógeno, se



300101

requieren también cantidades críticas de nutrientes minerales seleccionados en el medio para llevar al máximo la selectividad. Así, se requieren potasio, azufre y fósforo. Estos elementos pueden suministrarse

5. en forma de sus sales. Así, el potasio puede suministrarse como cloruro, fósforo, sulfato, citrato, acetato, nitrato potásico, etc. El azufre y el fósforo, se suministra en forma de sulfatos o fosfatos tales como

10. fosfatos metálicos alcalinos o amónico. Las preferidas cantidades críticas de minerales usados para llevar al máximo la selectividad son como sigue (cantidades para diferentes concentraciones de células obtenidas multiplicando por el porcentaje particular):

| Mineral | Preferidos porcentajes en peso de sales en medio acuoso suministradas, basadas en desarrollo 1% peso concentración células. | Porcentajes en peso especialmente preferidos sales en medio acuoso suministradas sobre la base desarrollo 1% peso concentración células. |
|--|---|--|
| H ₃ PO ₄ P | 0.01 - 1.0 | 0.05 - 0.25 |
| Na ₂ SO ₄ S & Na | 0.01 - 0.5 | 0.025 - 0.05 |
| KCl K & Cl | 0.01 - 0.05 | 0.05 - 0.10 |
| MgSO ₄ Mg | 0.005-0.5 | 0.02 - 0.05 |
| CaCl ₂ Ca | 0.005- 0.5 | 0.02 - 0.05 |

Además, se requieren también los siguientes minerales. pero las cantidades son menos críticas, como
15. seguidamente se expone:

330101 2



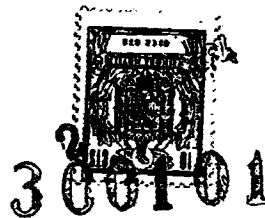
| Mineral | Preferido porcentaje peso sal-suministrada basado en desarrollo 1% peso concentración células. | Porcentaje peso especialmente preferido sal suministrada sobre base desarrollo 1% peso concentración células. |
|----------------------|--|---|
| FeSO ₄ Fe | 0.001 - 0.1 | 0.005 - 0.02 |
| MnSO ₄ Mn | 0.001 - 0.1 | 0.005 - 0.02 |

En todo lo que antecede, los iones indicados como suministrados como otras sales en cantidades estequiométricamente-iguales (por cálculo) pueden emplearse también menos preferiblemente.

5. Adicionalmente, el nitrógeno ha de ser suministrado como una sal, amoníaco, sal amónica o hidróxido amónico, preferiblemente en material amoniacal y mas preferiblemente hidróxido amónico en cantidades de 0,08 a 0,20 y preferiblemente de 0,1 a 0,15 gramos de nitrógeno por gramo de células secas producidas.

10. La temperatura del cultivo puede variarse entre 20 y 45°C aproximadamente, y preferiblemente entre 25 y 40°C. Para mantener adecuados niveles de temperatura, es ordinariamente necesario calentar el sistema durante las primeras etapas del comienzo, en tanto que al avanzar el cultivo, se observará que se genera calor en el mismo y por consiguiente será necesario un enfriamiento para mantener la deseada temperatura. Esto puede realizarse económicamente recirculando material a través de un refrigerador o utilizando serpentines de refrigeración en el reactor, como anteriormente se indica.

20. La cantidad de hidrocarburo suministrado (incluyendo recirculación) basada en el medio salino acuoso



(incluyendo NH_4OH) suministrado, es del 1 al 10% en peso y preferiblemente del 1 al 4% en peso y especialmente del 0,5 al 2% en peso cuando se emplea aire.

5. El tiempo de permanencia del líquido para la bacteria preferida, es decir el "Micrococcus cerificans" (artrobacteria), es decir el volumen de líquido en el reactor, dividido por la cantidad de materiales de alimentación suministrados (y productos retirados a fin de mantener un constante nivel líquido en el reactor) por hora, es en general de una a 10 horas, preferiblemente de 1 a 3 horas y mas preferiblemente de 1,5 a 2,5 horas. Estos preferidos tiempos de permanencia no solo mejoran la selectividad sino que además reducen las necesidades de oxígeno.
10. Se comprenderá más claramente la presente invención considerando los siguientes ejemplos.
- EJEMPLO 1.- Efecto de diferentes alimentaciones sobre la producción de bacterias y el desarrollo animal.
15. Se cultivó el Micrococcus cerificans en un medio salino acuoso que contenía una fracción de gas oil Lirik como única fuente de carbono. Se cosecharon las células producto por medio de centrifugación y se lavaron una vez con agua, se recentrifugaron y se lavaron dos veces con acetona, filtrándose luego. Se obtuvieron los siguientes resultados, incluyendo los derivados del uso de células bacterianas como única fuente de proteína en dietas para ratas, de acuerdo con el ensayo de evaluación proteínico descrito en "Official Methods of Analysis", 9ª edición, 1960, Sec. 39.133 (e) y (f). En
- 20.
- 25.
- 30.



este ensayo se añade la muestra en cuestión a una dieta de manera que el nivel proteínico de esta última sea del 9,09%. Se mantienen las ratas con esta dieta durante un período de 4 semanas. Se anotan semanalmente la ganancia en peso y el consumo de alimentos. Se calcula al final de la cuarta semana el peso ganado por unidad de alimento consumida y se compara el valor obtenido con el obtenido en un ensayo simultáneo en el que la fuente de proteína es caseína. Se emplean 10 ratas para los ensayos con caseína y con la muestra.

| Material alimentación. | % peso para-fina. | Producción células. | Valor nutritivo biológico (caseína=100) método desarrollo ratas |
|------------------------|-------------------|---------------------|---|
| Gas oil Lirik | 60 | 59 | 59 |
| Cera débil | 76 | 97 | 53 |
| Exadecano | 100 | 105 | 76 |

La mejora en el valor nutritivo puede atribuirse probablemente al hecho de que los residuos hidrocarbonados sin reaccionar procedentes del gas oil y de la cera débil son inhibidores de desarrollo animal, mientras

que las parafinas puras o relativamente puras (es decir purificadas como aquí se describe) no muestran efectos adversos. Esto se ilustra mediante los siguientes datos experimentales adicionales. El lavado acetónico del gas oil Lirik se concentró por ebullición de la acetona primero a presión atmosférica y luego en vacío. Después de extraer el residuo oleoso con un 5% de NaOH para separar cualesquiera ácidos orgánicos, se sometió la fracción neutra a un análisis espectrométrico en masa y se observó que tenía la siguiente composición:



390101

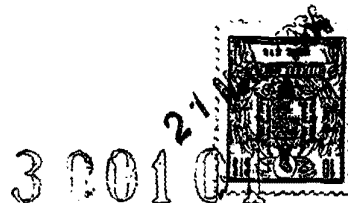
31,4% de parafinas, 19,2% de naftenos y 49,4% de aromáticos. Este material se mezcló luego con caseína de referencia ANRC (American Nutritional Research Council) a niveles del 1,3 y 5% en peso y esta caseína fué usada

- 5. como única fuente de proteína en las dietas para las ratas de acuerdo con el ensayo de evaluación de proteínas descrito en "Official Methods of Analysis", 9ª edición, 1960, Sec. 39.133 (c) y (f). De igual manera, se preparó una serie de muestras de caseína conteniendo 1, 3, 5, 7
- 10. y 10% de parafinas purificadas, (criba molecular 5A y limpieza) que consistían en parafinas normales esencialmente puras con 70 ppm. aproximadamente de aromáticos.

Se comparó el desarrollo medio de las ratas con estas dietas con el desarrollo medio de las mismas con caseína sin adulterar (10 ratas por muestra de ensayo) durante un período de 4 semanas. Los resultados de este ensayo se muestran en la siguiente tabla.

| Nivel de hidrocarburo en caseína (% peso). | Desarrollo ratas como % control caseína | |
|--|---|----------------------------|
| | Residuo gas oil Lírik | Parafinas criba molecular. |
| 1 | 77,5 | 103 |
| 3 | 75.0 | 100 |
| 5 | 61.9 | 104 |
| 7 | - | 94 |
| 10 | - | 103 |

- 20. Se obtiene otra prueba del efecto inhibitor del material extractable acetónico por el hecho de que cuando no se lavó con acetona el *Micrococcus cerificans* HO-1, desarrollado en cera débil, era virtualmente sin ningún



5. valor como suplemento proteínico, puesto que las ratas desarrolladas con una dieta que contenía este material como única fuente de proteínas ganaron solamente 5 gramos en dos semanas, que representaba solamente el 14% de las desarrolladas con el control caseínico en el mismo período.

EJEMPLO 2.- Carácter crítico del tiempo de permanencia.

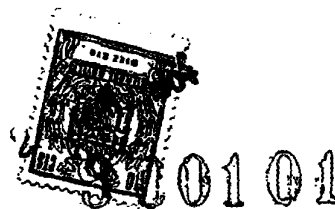
Se cultivó continuamente *Micrococcus cereficans* en el siguiente medio:

| | <u>Gramos/litro</u> |
|--------------------------------------|---------------------|
| Cera débil | 10-20 |
| Spann 60 - Tweens 60 | 0.6-1.2 |
| H ₃ PO ₄ | 5 |
| KCl | 1 |
| CaCl ₂ | 0.5 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 0.2 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 |
| NaCl | 0.2 |

10. Se añadió NH₄OH concentrado en la medida necesaria para controlar el pH en 7.

Los anteriores nutrientes se disolvieron o dispersaron en agua del grifo para obtener las concentraciones deseadas.

15. Se mantuvo la temperatura de la reacción en 30°C y la fermentación se llevó a cabo en un fermentador Neuw Brunswick de 7,5 litros, con una capacidad de funcionamiento de 4 litros. Se variaron el ritmo de flujo de aire y la velocidad del agitador a fin de obtener



unas eficiencias de aireación de 3,5 a 7,0 milimoles de O_2 por litro por minuto, medidas por el método de oxidación de sulfitos de Cooper y Fernstrom, Ind. & Eng. Chem. 36, 405-509 (1944).

5. El tiempo de permanencia en el fermentador se varió de 1,3 a 4,0 horas y seguidamente se muestra el efecto de la variación:

| Tiempo de permanencia en horas | Selectividad. % en peso células secas basado en cera débil convertidas a células y CO_2 |
|--------------------------------|---|
| 4.0 | 107 |
| 4.0 | 102 |
| 2.0 | 120 |
| 2.0 | 128 |
| 2.0 | 134 |
| 2.0 | 133 |
| 2.0 | 121 |
| 1.3 | 138 |

10. Debe destacarse que esta mejora es grande no solo debido a la incrementada selectividad, sino también porque esta mejora del 30% reduce también las necesidades de oxígeno y las de separación de calor en un 50%.

15. Se repitió este experimento empleando una alimentación parafínica normal pura, es decir n-eradecano, y se efectuaron análisis de hidrocarburo sin reaccionar por medio de fractometría de vapores. En este caso, fué posible calcular selectividades como % producto neto formado unidad de hidrocarburo consumido. Estos resulta-



300101

dos se muestran seguidamente:

| Tiempo permanencia (horas) | Selectividad. (% peso células secas basado en hidrocarburo consumido). |
|----------------------------|--|
| 4 | 105 ± 2 |
| 2 | 116 ± 6 |

Cada uno de estos valores representa un promedio de 5 a 6 pruebas experimentales.

EJEMPLO 3.- Carácter crítico del nivel de aire.

5. Se cultivó *Micrococcus cerificans* como se describe en el ejemplo 2, usando una cera débil con una concentración de 20 gramos por litro. Se variaron la velocidad del agitador y el nivel de aire en dos experimentos y seguidamente se muestran los resultados:

| Eficiencia aireación (milimoles O ₂ /litro/minuto). | Tiempo permanencia en reactor. | Nivel aire (V/V ml nuto). | Porcentaje peso hidrocarburo basado medio acuoso salino inorgánico. | Velocidad agitador (r.p.m.). | Porcentaje producción células (basado en cera añadida). |
|--|--------------------------------|---------------------------|---|------------------------------|---|
| 4.8 | 4 hr. | 1 | 2 | 1200 | 44.4 |
| 7.0 | 4 hr. | 1.5 | 2 | 1400 | 98.1 |

EJEMPLO 4.- Efecto de un reducido tiempo de permanencia sobre la utilización de O₂ y desprendimiento de calor.

10. De igual manera a como se describe en los ejemplos 2 y 3, se efectuaron fermentaciones continuas bajo condiciones idénticas, a excepción del tiempo medio de permanencia en el reactor. Las condiciones fueron como sigue:

15.



| <u>Medio de alimentación</u> | <u>Gramos/litro</u> |
|--------------------------------------|---------------------|
| n-exadecano | 10.0 |
| 85% H ₃ PO ₄ | 2.5 |
| KCl | 1.0 |
| Na ₂ SO ₄ | 0.5 |
| MgSO ₄ | 0.25 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0.04 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.04 |
| CaCl ₂ | 0.5 |

Resto agua del grifo

Reactor 7,5 litros, 4 litros volumen líquido.
 Ritmo alimentación aire 3,0 litros por minuto.
 pH mantenido a 7,0 mediante adición NH₄OH.
 Velocidad del agitador 1.500 r.p.m.
 Temperatura 35°C.

Resultados:

| <u>Tiempo de permanencia (horas)</u> | <u>Selectividad (porcentaje peso células secas basado en exadecano consumido).</u> | <u>Consumo oxígeno en litros por litro de células secas.</u> | <u>Producción CO₂ por litro de células secas.</u> |
|--------------------------------------|--|--|--|
| 4 | 1.13 | 1.27 | 0.97 |
| 2 | 1.30 | 0.89 | 0.62 |

Otros ensayos similares han dado consistentemente el mismo resultado. Aunque la selectividad y el consumo de oxígeno varían algo de acuerdo con otras condiciones, las tendencias con el tiempo de permanencia son siempre las mismas.

5.

EJEMPLO 5.- Tiempo mínimo de generación.

Repetidamente con *Micrococcus cerificans* y adescu-



dos medios salinos, tales como los mostrados en los ejemplos 2 y 6, se ha observado un desarrollo (logarítmico) en reactores de 7,5 litros agitados a 1.500 r.p.m. y con suficiente alimentación de aire para mantener la presión parcial del oxígeno gaseoso separado por encima de 0,1

5.

l.p.c. La medida ordinaria del desarrollo logarítmico ha sido la concentración en CO₂ como gas separado, que se duplicó cada 45 minutos ± 10 minutos. En algunos casos, se supervisó también la concentración celular y los resultados confirmaron la medición de CO₂. Así, el tiempo mínimo de generación para el Micrococcus es de 45 minutos ± 10 minutos.

10.

EJEMPLO 6 .- Caracter crítico del medio de reacción salino inorgánico.

15.

Se cultivó por cargas el Micrococcus cerificans en matraces agitables usando un matraz Erlenmeyer de 50 ml/ 500 ml sobre un agitador giratorio a 250 r.p.m. y un tiempo de fermentación de 70 horas sobre n-exadecano, usando los siguientes medios salinos inorgánicos:

| | <u>Gramos/litro</u> |
|---|---------------------|
| NaNO ₃ | 2.0 |
| KaHPO ₄ | 1.0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.5 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 0.01 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0.008 |
| ZnSO ₄ .H ₂ O | 0.002 |

20.

Se ajustó el pH en 7,2 con ClH 1N. Se obtuvo una concentración celular de 2.0 mg/ml que bajo estas condi-



300101

5. ciones asciende a una producción del 12,9%, basado en la cantidad de exadecano cargada. Al incrementarse la concentración de NO_3Na a 12 gramos por litro, la concentración celular incrementó a 4,5 mg por ml para una producción del 29%. Bajo idénticas condiciones con el medio descrito en el ejemplo 2, se obtuvieron concentraciones celulares de 9,4 mg por ml y la producción del 60,6%.

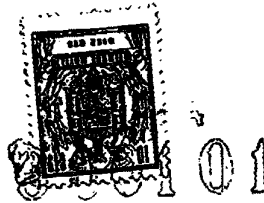
EJEMPLO 7.- Usando las condiciones descritas en el

10. ejemplo 2, con tiempo de permanencia de dos horas, se cultivó *Micrococcus cerificans* sobre n-exadecano a niveles del 1 al 2% en peso aproximadamente y aire y O_2 puro como fuentes de oxígeno, Cuando el nivel de hidrocarburo fué del 1%, hubo muy poco efecto por el uso de oxígeno puro. Sin embargo, a un nivel de hidrocarburo del 2%, el oxígeno puro mejoró notablemente la utilización del hidrocarburo, como indican los siguientes datos:

15.

| Concentración n-exadecano (g/l) | Fuente O_2 | Selectividad (g células/g C_{16} convertido). | Conversión exadecano |
|---------------------------------|---------------------|--|----------------------|
| 9.3 | Aire | 1.14 | 96 |
| 10.9 | O_2 | 1.20 | 91 |
| 19.1 | O_2 | 1.13 | 85 |
| 19.1 | Aire | 1.12 | 73 |

20. Se comprenderá que esta invención no se limita a los ejemplos específicos, que se han ofrecido simplemente como ilustraciones, y que pueden introducirse modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención.



NOTA

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento se refiere a unas Solicitudes de Patentes presentadas en Norteamérica, con fecha 21 de mayo de 1963, nº 281.895 y el 15 de abril de 1964, nº 360.141, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN ALIMENTO ALTAMENTE PROTEINICO"; caracterizándose por lo siguiente:

1º.- "Procedimiento de preparación de un alimento altamente proteínico", caracterizado porque comprende el suministro continuo de un hidrocarburo C_1-C_{30} , un medio líquido de cultivo de sales inorgánicas acuosas y un gas que contiene oxígeno, a un reactor agitado que contiene al citado hidrocarburo, medio acuoso y bacteria capaz de desarrollo en dicho hidrocarburo, la retirada continua de una mezcla de bacteria, medio acuoso e hidrocarburo sin convertir, y la separación de la bacteria para obtener un excelente alimento.

2º.- Procedimiento de preparación de un alimento altamente proteínico, caracterizado porque comprende el suministro continuo de un hidrocarburo C_1-C_{30} , un medio de cultivo líquido no limitador, de sales inorgánicas

300101



5. acuosas y un exceso de gas conteniendo oxígeno a un reactor vigorosamente aplicado que contiene a dicho hidrocarburo, medio acuoso y una bacteria capaz de desarrollo en dicho hidrocarburo, encontrándose la citada bacteria en la fase logarítmica, población que incrementa exponencialmente, de desarrollo y encontrándose presente en una concentración igual o mayor que aquella para la cual el incremento exponencial de incremento de población es igual al incremento continuamente retirado, la continúa retirada de una mezcla de bacteria, medio acuoso e hidrocarburo sin convertir, y la separación de la bacteria para obtener directamente un excelente alimento para animales.
- 10.
15. 3ª.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el material separado de la bacteria es recirculado al reactor.
20. 4ª.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el tiempo de permanencia del líquido es de 1,5 a 4 veces el tiempo mínimo de generación para la bacteria particular.
25. 5ª.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el gas que contiene oxígeno suministrado al reactor es 0,5 a 4 volúmenes de aire por volumen de líquido en el reactor por minuto por porcentaje en peso de concentración de bacteria seca en el reactor por el tiempo de permanencia del líquido en horas.
30. 6ª.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el hidrocarburo es un hidrocarburo normalmente gaseoso.

300101



7^a.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el hidrocarburo es una nafta ligera.

5. 8^a.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el hidrocarburo es un alimento parafínico normal que hierve entre 190 y 400°C y que contiene menos del 0,1% en peso de aromáticos.

10. 9^a.- Procedimiento de preparación de un alimento altamente proteínico, caracterizado porque comprende el suministro continuo de una mezcla del 0,1 al 10% en peso de una alimentación parafínica normal que hierve entre 190 y 400°C y que contiene menos del 0,1% en peso de aromáticos en un medio de desarrollo acuoso de sales inorgánicas y un gas que contiene oxígeno a un reactor agitado inoculado con *Micrococcus cereificans*, la continua retirada de una mezcla de bacteria, medio acuoso y parafina sin convertir, la separación de bacteria que contiene del 80 al 95% en peso de líquido basado en las células, y el secado de la bacteria para obtener directamente un alimento excelente.

20. 10^a.- El procedimiento de la reivindicación 9, caracterizado porque el tiempo de permanencia en el reactor es de 1,5 a 2,5 horas.

25. 11^a.- El procedimiento de la reivindicación 9, caracterizado porque la mezcla suministrada contiene del 1 al 5% en peso de la parafina normal y se emplea aire enriquecido en oxígeno que contiene el 90 % de oxígeno.

30. 12^a.- El procedimiento de la reivindicación 9, caracterizado porque el medio de desarrollo acuoso de



0101

sales inorgánicas es suministrado en las siguientes cantidades, basándose en cada caso el porcentaje en peso de sal suministrada en el producto de bacteria seca recuperado por unidad de tiempo: 0,05 a 0,25% en peso de PO_4H_3 ; 0,025 a 0,05% en peso de SO_4Na_2 ; 0,05 a 0,10% en peso de ClK ; 0,02 a 0,05% en peso de SO_4Mg ; 0,02 a 0,05% en peso de Cl_2Ca ; 0,005 a 0,02% en peso de SO_4Fe y 0,005 a 0,02% en peso de SO_4Mn .

- 5.
10. 13^a.— El procedimiento de la reivindicación 9, caracterizado porque el tiempo de permanencia en el reactor es de 1 a 2 horas, la mezcla suministrada contiene del 4 al 8% en peso de la parafina normal y se emplea aire enriquecido en oxígeno que contiene el 90% de oxígeno, la cantidad de oxígeno suministrado es de 1,5 a 2,5 kg por kg de producto de bacteria seca recuperada por unidad de tiempo, y el medio de desarrollo acuoso de sales inorgánicas se suministra en las siguientes cantidades, basándose en cada caso el porcentaje en peso de sal suministrada en el producto de bacteria seca recuperada por unidad de tiempo: 0,05 a 0,25% en peso de PO_4H_3 ; 0,025 a 0,05% en peso de SO_4Na_2 ; 0,05 a 0,10% en peso de ClK ; 0,02 a 0,05% en peso de SO_4Mg ; 0,02 a 0,05% en peso de Cl_2Ca ; 0,005 a 0,02% en peso de SO_4Fe y 0,005 a 0,02% en peso de SO_4Mn .
- 15.
- 20.

25. 14^a.— Procedimiento de preparación de un alimento altamente proteínico, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 33 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 29 MAY. 1951

30.

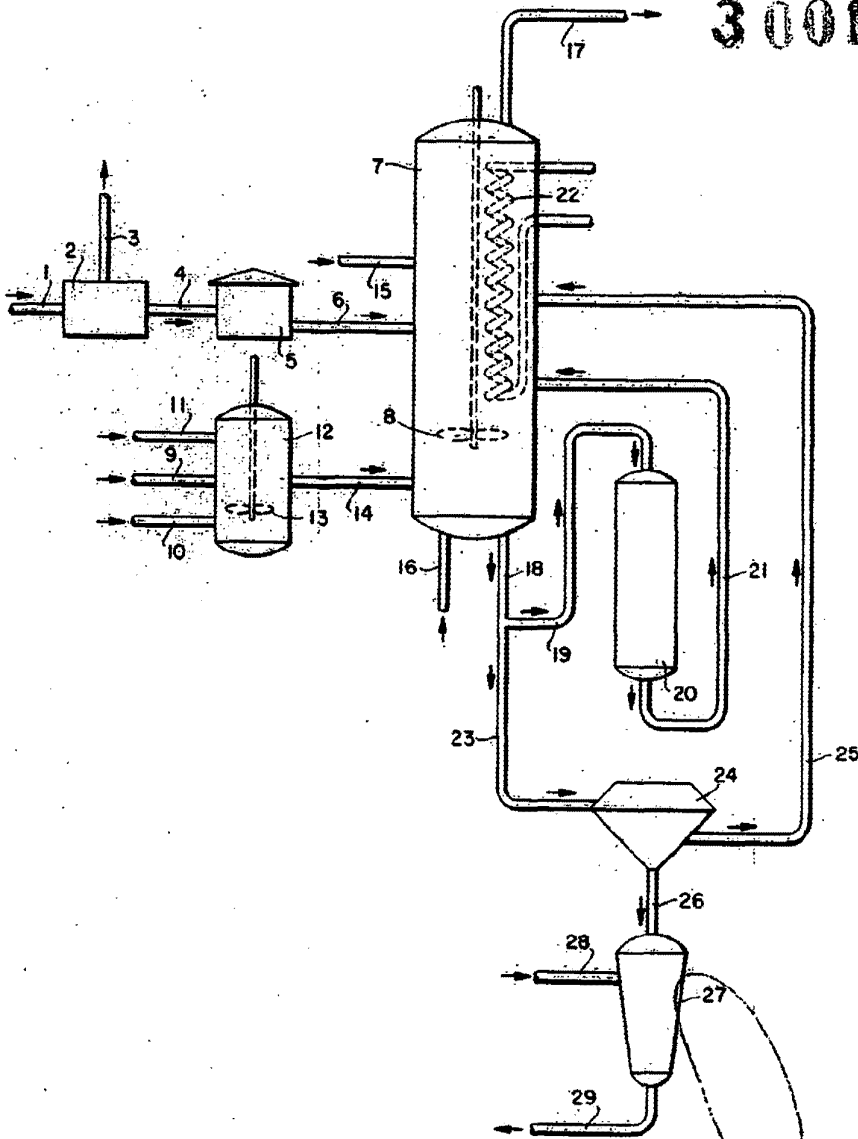
ESSO RESEARCH AND ENGINEERING COMPANY

300101

ESCALA VARIABLE



300101



Madrid,