

335,718

P.- 34.120

U.S. 520.858 filed
1/17/66



335718

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de ESSO RESEARCH AND ENGINEERING COMPANY, entidad norteamericana, establecida en Elizabeth, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE SEPARAR MICROORGANISMOS"

=====

Este invento se refiere a un procedimiento para facilitar la recuperación o separación de microorganismos desde un medio acuoso. En particular, este invento se refiere a un procedimiento que comprende poner en contacto un medio acuoso que contiene células microbianas con un líquido orgánico inmiscible, para formar una fase acuosa y una fase orgánica, y recuperar dichas células microbianas de dicha fase orgánica. Más particularmente, este invento se refiere a un método mejorado para recoger una cosecha de microorganismos desde un medio acuoso, que comprende mezclar un líquido orgánico clo-

7.3.67

- 1 -



rado, volátil e inmiscible , con dicho medio acuoso a una temperatura entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 55°C, y recuperar dichos microorganismos desde la fase orgánica resultante. Todavía más particularmente, este invento se refiere a un procedimiento que comprende:(a) cultivar un microorganismos en un medio de crecimiento acuoso que comprende un inoculador de células de microorganismos, un manantial de carbono, hidrógeno y oxígeno, y nutrientes de células esenciales; (b) retirar una porción de dicho medio de crecimiento acuoso que contiene dichas células de microorganismos; (c) mezclar un líquido orgánico inmiscible con dicha porción para formar una fase acuosa y una fase orgánica y(d) recuperar dichas células de microorganismos desde dicha fase orgánica.

Es bien conocida la actual escasez mundial de proteínas especialmente proteínas animales de bajo costo, para consumo por animales y seres humanos. En un intento de mitigar escasez de proteínas, se han desarrollado recientemente varios procedimiento biosintéticos en los que se pueden crear proteínas vivas por el crecimiento de levaduras, hongos y/o bacterias sobre diversos materiales de substrato que contienen carbono. Una de dichas técnicas implica hacer crecer diversos microorganismos sobre substratos de carbohidrato(hidrato de carbono). Sin embargo, la mayor parte de estos procedimientos requiere vitaminas y otros medios de crecimiento caros para asegurar el crecimiento deseado de microorganismos.

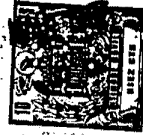
Otra técnica reciente e incluso más prometedora para sintetizar biosintéticamente proteínas de alimentos, es el cultivo de microorganismos sobre substratos de petróleo. Este último tipo de síntesis de proteínas se

335718



conduce usualmente en un medio de crecimiento acuoso que contiene: alimentación hidrocarbonada, un inoculador del microorganismo que ha de ser cultivado, oxígeno, y nutrientes de células esenciales. Este tipo de síntesis de proteínas permite la utilización de alimentaciones hidrocarbonadas, que son menos caras que los carbohidratos, y no requieren usualmente factores de crecimiento caros tales como vitaminas, amino ácidos, etc. con el fin de asegurar el crecimiento apropiado de microorganismos.

Una grave desventaja para la amplia aceptación de la técnica biosintética que emplea hidrocarburos como manantial de alimentación, es el hecho de que las células de microorganismos de producto tienen frecuentemente un tamaño muy pequeño, por ejemplo entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5,0 micras e incluso menor. Con dichas pequeñas células de microorganismos, es difícil y frecuentemente muy caro lograr la recuperación de las células de microorganismos. Un factor que conduce a gastos en la recuperación de células de microorganismos de producto es la dificultad en separar las células del medio de crecimiento acuoso que las contiene, ya que las células están presentes generalmente en bajas concentraciones, por ejemplo entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5% en peso. Otro factor sobre-saliente, que aumenta el costo de recuperación es la eliminación requerida de cantidades de agua comparativamente grandes atraídas y mantenidas por las células y dentro de ellas, incluyendo el agua de intersticios presente en las paredes celulares del microorganismo. Además, la similaridad de densidades del microorganismo y del medio de crecimiento acuoso hace difícil la centrifugación; y



la pegajosidad de los microorganismos inhibe la utilización de filtración. Este y otros factores afines sirven para aumentar el costo global de la recuperación de microorganismos cultivados.

5 Los procedimientos de separación y deshidratación pueden ascender a constituir hasta un 25% o más del coste total de producción de microorganismos en forma apropiada para ser utilizados en alimentos o en suplementos para alimentos con alto contenido de proteínas. Por lo tanto se comprobará, que cualquier mejora sustancial en la realización de la separación y deshidratación de células de microorganismos desde la fase acuosa que los contiene, dará como resultado significativos ahorros económicos, y reducirá de esta manera el costo global de producción de alimentos y suplementos para alimentos con alto contenido de proteínas.

10

15

Por esto, uno objeto del presente invento es crear un procedimiento para facilitar la separación de la concentración relativamente pequeña de células de microorganismos desde el volumen de agua comparativamente mayor que contiene dichas células.

20

En una biosíntesis convencional, se cultiva un microorganismo en un medio de crecimiento acuoso que contiene un inculador de dicho microorganismo, un manantial de carbono, hidrógeno y oxígeno, y nutrientes de células esenciales. Cuando el crecimiento de las células llega al nivel deseado, se retira una porción del medio de crecimiento acuoso como fluido saliente, y las células de producto separadas del líquido saliente son hechas no viables o incapaces de vivir y son secadas. El resto del fluido sa-

25

30

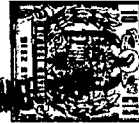
335718



5 saliente es reciclado, generalmente, al reactor de fermentación, en el cual continúa el cultivo. De acuerdo con el presente procedimiento, un líquido orgánico inmiscible es mezclado o puesto en contacto íntimo con el fluido saliente acuoso del reactor de fermentación, antes de la separación de las células de producto. Como resultado de este mezclado, las células microbianas se aglomeran y parece que forman un precipitado estabilizado de la naturaleza de una emulsión dentro del líquido orgánico. Sin embargo, no se conoce con certidumbre la manera exacta en que transcurre la aglomeración. Ya que el líquido orgánico es inmiscible con la fase acuosa, la mezcla se separa fácilmente, y sedimenta en una fase acuosa y una fase orgánica. Como resultado, las dos fases pueden ser separadas fácilmente, por ejemplo por centrifugación o decantación, y las células microbianas de producto pueden ser recuperadas de la fase orgánica por evaporación del disolvente orgánico y secado de las células.

10 El líquido orgánico empleado en el presente procedimiento es, en general, un líquido orgánico inmiscible que moja preferentemente a las células de microorganismos. Además, se prefiere, aunque no es esencial, que el líquido orgánico tenga una densidad mayor que la fase acuosa con la que es mezclado, es decir, tenga una densidad mayor que 1,0 (D_{H_2O}); y que pueda ser fácilmente volatilizado. Estas características adicionales permiten una mayor facilidad para separar la fase orgánica y la fase acuosa, y para secar las células microbianas de producto. Para los fines del presente procedimiento, se considera que un líquido orgánico es volátil si su calor de evaporación es menor

335718



que el del agua. Aunque el líquido orgánico sólo necesita tener un calor de evaporación por debajo de el del agua, se prefiere que su calor de evaporación sea sustancialmente menor que el del agua, por la razón de que cuando dicho valor es pequeño, se requiere menos calor para evaporar el líquido orgánico. Cuanto menor es el calor requerido, mejor es la economía de la recuperación de células. Por ejemplo, el calor de evaporación del agua es de 595,9 calorías por gramo. En comparación, el calor de evaporación del tetracloruro de carbono es de 46,4 calorías por g.

Aunque se puede emplear en el presente procedimiento cualquier líquido orgánico inmiscible que moje preferentemente las células de microorganismos, hay algunos que son especialmente apropiados. Estos incluyen, por ejemplo compuestos alifáticos (parafinas y olefinas) C_{1-4} halogenados preferiblemente compuestos alifáticos C_{1-4} polihalogenados, disulfuro de carbono y tolueno. Ejemplos específicos de las parafinas halogenadas anteriormente descritas incluyen: cloroformo, cloruro de metilo, tetracloruro de carbono, bromuro de metilo, triclorofluorometano, diclorofluorometano, 1-bromo-2-cloroetano, 1,1-dibromoetano, 1,1-dicloroetano, 1,2 dicloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,2 dicloroetano, pentacloroetano, 1,1,1,2-tetrabromoetano, 1,1,1,2-tetracloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano, 1,1,2,2-tetracloro-1,2-difluoroetano, bromuro de etilo, 1,1,-dicloropropano, 1,2-dicloropropano, 1,3-dicloropropano, 2,2-dicloropropano, bromotriclorometano, 1,1,2-tribromoetano, 1,1,1,-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1,2-tricloro-1,2,2,-trifluoroetano, 1-bromo-2-cloro

335718



propano, 2-bromo-1-cloropropano, 1,2-dibromopropano, 1,3-dibromopropano, 2,2-dibromo propano, 1,2,3,-tricloro propano, 1-clorobutano, 2-bromobutano, 2-bromo-2-metilpropano, etc. De esta manera, están incluidos dentro de la descripción de las anteriores parafinas halogenadas, los compuestos que contienen uno o varios halógenos iguales o distintos, es decir bromo, cloro y fluor.

La puesta en contacto del líquido orgánico inmiscible y de la fase acuosa que contiene los microorganismos puede tener lugar a la temperatura de crecimiento de las células de microorganismos o por encima de ella, lo que se conduce convencionalmente en un reactor de fermentación apropiado. Se pueden emplear temperaturas por encima de la temperatura de crecimiento de células, pero deberán estar por debajo de la temperatura a la que tiene lugar una degradación significativa de proteínas. Preferiblemente, el mezclado se realiza a una temperatura entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 55°C, más preferiblemente entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 45°C y lo más preferiblemente a aproximadamente 40°C. El mezclado se puede realizar en uno o más recipientes de mezcla, seguido por uno o más recipientes de sedimentación, y se puede lograr por cualquier medio convencional, tal como mediante agitadores, etc. Alternativamente, el fluido saliente acuoso puede ser puesto en contacto con el líquido orgánico por medio de una columna de contacto de disco rotatorio u otra columna de contracorriente.

La degradación de proteínas se refiere a la descomposición molecular de las proteínas celulares y aminoácidos esenciales en subproductos de menor peso molecular

335718



y/o nutritivamente menos deseables, por ejemplo por hidrólisis ácida de los mismos, cuyos subproductos no son capaces de contribuir al valor nutritivo de las proteínas y/o aminoácidos de las células de microorganismos no viables o de otros productos nutritivamente valiosos con tenidos en las células.

5

El tiempo de permanencia, es decir, el periodo de tiempo en que el líquido orgánico inmisible está en contacto con el fluido saliente acuoso, oscila en general entre aproximadamente un minuto y aproximadamente una hora o más, preferiblemente entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 30 minutos. No resulta ninguna ventaja significativa de la prolongación del tiempo de permanencia a más de aproximadamente 30 minutos, pero si se desea se pueden emplear tiempos de permanencia pro longados más allá de los descritos, ya que el tiempo de permanencia no es crítico.

10

15

La cantidad de líquido orgánico inmisible que es mezclado con el fluido saliente acuoso puede variar dentro de un amplio margen. En general, la relación volumétrica de líquido orgánico a fluido saliente acuoso oscila entre aproximadamente 1:20 y aproximadamente 100:1. Preferiblemente, la relación volumétrica de líquido orgánico a fluido saliente acuoso varía entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 10:1, y más preferiblemente entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1. No es crítica la cantidad de líquido empleado, y variará con sus características físicas.

20

25

Tal como se ha indicado anteriormente, cuando se mezclan el líquido orgánico y el fluido saliente

30

335718



acuoso, las células de microorganismos se aglomeran dentro del líquido orgánico en forma de un precipitado o emulsión estabilizado. El aglomerado flota o se hunde, dependiendo de la naturaleza del líquido orgánico empleado.

5 De forma típica, el 60 a 70% del agua en el fluido saliente acuoso inicial permanece en la fase acuosa, formando el 30 a 40% restante una suspensión con las células de microorganismos y el líquido orgánico. Tiempos de permanencia de más de 15 minutos dan como resultado una nueva descomposición de la suspensión y consiguiente transferencia de agua

10 a la fase acuosa; sin embargo, sustancialmente todas las células contenidas en el fluido saliente acuoso se encuentran en la fase orgánica inmediatamente después del mezclado y la sedimentación.

15 Ya que el líquido orgánico es inmisible con el fluido saliente acuoso, el mezclado de ambos da como resultado la formación de una fase acuosa y una fase orgánica. Estas fases se separan rápidamente al terminar el mezclado y después de esto pueden ser fácilmente segregadas

20 por cualquier método convencional, por ejemplo por decantación. El líquido orgánico que contiene las células de microorganismos es sometido entonces a una nueva operación de separación (filtración, centrifugación) y/o volatilización mediante cualquier técnica apropiada, tal como por

25 un matraz de congelación, un secador de tambor, un secador por pulverización, un secador por evaporación súbita, etc., y las células de microorganismos son recuperadas de esta manera. El líquido orgánico volatilizado puede ser recuperado, si se desea, por técnicas conocidas y puede ser lavado

30 o tratado, si es necesario, y después puede ser reciclado.

335718



do como alimentación de nueva aportación.

Después que las células de microorganismos han sido separadas del líquido orgánico, las células pueden ser hechas pasar a cualquier dispositivo apropiado de secado, por ejemplo un secador por pulverización, para realizar el secado de las células y hacer a las células completamente no viable. Las células de producto secado pueden ser utilizadas entonces como suplemento para alimentos. Sin embargo, no es obligatorio el secado de las células ya que las células separadas pueden ser empleadas directamente para utilizaciones no alimenticias, por ejemplo para recuperar productos químicos intracelulares tales como ésteres; o puede ser hechas no viables por procedimientos distintos del secado, y entonces pueden ser utilizadas como suplementos para alimentos.

Cuando la fermentación se conduce para producir microorganismos ricos en proteínas para fines de alimentación, las células son hechas completamente no viables antes de dicha utilización. USualmente, las células son muertas calentando, en secadores por pulverización, a las temperaturas apropiadas durante los periodos de tiempo requeridos. Las temperaturas y tiempos específicos dependerán en cualquier caso dado del microorganismo específico que es muerto de la extensión de la pasterización deseada, etc. Sin embargo, se deberá cuidar de evitar utilizar temperaturas tan altas que degraden las proteínas celulares.

Las temperaturas que provocan la muerte celular suelen oscilar entre aproximadamente 65°C y aproximadamente 232°C durante periodos de tiempo entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 2 horas, empleándose los periodos

335718

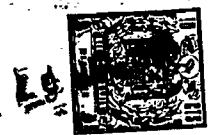


de tiempo más cortos a las temperaturas mayores, y vice-versa, Usualmente, son satisfactorias temperaturas entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 15 minutos para hacer a la mayor parte de los microorganismos completamente no viables. Se pueden utilizar, y usualmente se utilizan, presiones superiores a la atmosférica, por ejemplo de 2 a 50 atmósferas, cuando la pasteurización se conduce utilizando las temperaturas más bajas, por ejemplo de 116 a 121°C, y los periodos de tiempo correspondientes.

El método presentemente descrito para recuperar células microbianas es aplicable a cualquier procedimiento de fermentación, empleado para cultivar microorganismos sobre materiales de substrato que contienen carbono, por ejemplo substratos de carbohidrato y petróleo. El presente método de recuperación es especialmente apropiado en procedimientos de fermentación en los que se emplean materiales de alimentación hidrocarbonados como alimentación. Gran parte de la presente memoria será dedicada, por lo tanto, a una descripción de dicha fermentación.

Alimentaciones hidrocarbonadas que se pueden utilizar en fermentaciones microbiológicas son alimentaciones de petróleo C_1-C_{35} , preferiblemente aceites pesados ó gas oils que hierven en el margen entre aproximadamente 190°C y aproximadamente 400°C, más preferiblemente entre aproximadamente 190°C y aproximadamente 320°C. Otras alimentaciones apropiadas son hidrocarburos C_1-C_{35} normales e isoparafínicos, cicloparafínicos, monoolefínicos, diolefínicos, aromáticos y mezclas de los mismos. Alimentaciones disponibles en grandes cantidades, y las particularmente apropiadas son parafinas normales $C_{11}-C_{30}$ procedentes de aceites

335718



5 pesados o gas-oils, naftas ligeras, y alimentaciones normalmente gaseosas, tales como metano, etano y propano, y mezclas de los mismos, tales como gas natural. Cuando se utilizan alimentaciones normalmente gaseosas, estas son

5 suministradas preferiblemente desde luego, como gases directamente al medio de crecimiento acuoso mediante rociadores. Otra alimentación todavía más preferida es una que contiene un porcentaje en peso sustancial, por ejemplo

10 70% en peso, de hidrocarburos, parafínicos normales (de cadena recta) que tiene de 1 a 35 átomos de carbono. Aunque se puede tolerar la presencia de hidrocarburos ramificados no aromáticos, en cantidades hasta de 30% en peso en la alimentación hidrocarbonada, se evitan usualmente

15 concentraciones por encima de 10% en peso de hidrocarburos no aromáticos no normales, ya que los microorganismos seguidamente descritos son selectivos preferentemente para hidrocarburos normales, especialmente n-parafinas de cadena corta ($C_{12}-C_{20}$).

20 La alimentación hidrocarbonada más preferida es un material de alimentación C_6-C_{30} que ha sido purificado para reducir el nivel de compuestos aromáticos tanto policíclicos como monocíclicos hasta menos de 0,5% en peso, preferiblemente menos de 0,1% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 p.p.m.

25 Un procedimiento preferido para purificar la alimentación hidrocarbonada consiste en adsorber los hidrocarburos normales, preferiblemente parafinas, por tamices moleculares de 5\AA , seguido por desorción depuración de los hidrocarburos normales desorbidos con tamices 13X o gel de

30 sílice, para adsorber las impurezas remanentes, incluyendo



compuestos aromáticos. Este procedimiento adsorbe selectivamente los hidrocarburos de cadena recta sobre los tamices moleculares, y de esta manera los purifica sustancialmente forma completa de aromáticos. Un método de llevar a cabo este procedimiento de purificación esta descrito en la patente USA 3.070.542. La operación de depuración de los hidrocarburos noramles desorbidos se puede realizar de una manera descrita en la patente USA 3.228.995 o en la pamente USA 3.233.003.

La alimentación hidrocarbonada purificada contiene usualmente aproximadamente más de 90% en peso de n-parafinas $C_{11}-C_{35}$ y hasta aproximadamente 10% en peso de n-olefinas. La alimentación hidrocarbonada purificada preferida contiene aproximadamente más de 95% en peso de parafinas normales $C_{11}-C_{30}$ y hasta aproximadamente 5% en peso de olefinas normales, que contienen 11 a 30 átomos de carbono. La alimentación de parafinas normales $C_{11}-C_{30}$ Puede ser alimentaciones de petróleo, por ejemplo aceites pesados o gas-oils que hierven en el margen de aproximadamente 190°C a aproximadamente 400°C, y más preferiblemente de aproximadamente 190°C a aproximadamente 320°C.

La cantidad de alimentación hidrocarbonada suministrada, basada en el medio de crecimiento acuoso total suministrado, está entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10% en peso, preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5% en peso, y especialmente entre aproximadamente 0,5 y 2% en peso, cuando se utiliza aire puro como medio portador de oxígeno. Cuando se utilizan gases enriquezidos en oxígeno, por ejemplo gases que tienen más de 70% en peso de oxígeno, una cantidad preferida de

335718



hidrocarburos suministrados al reactor está entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 5,0% en peso, basado sobre el medio de crecimiento acuoso total. El porcentaje en peso de, por ejemplo, hidrocarburos normales $C_{11}-C_{30}$ que existen realmente en la zona de suspensión del reactor de fermentación durante el crecimiento celular y la actividad, puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,0% en peso, pero usualmente oscila entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,1, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,05% en peso, basado sobre el medio de crecimiento líquido total.

El procedimiento de recuperación mejorado del procedimiento presentemente descrito es aplicable a todos los cultivos microbiológicos. Así, cualquier microorganismo que se emplee en cultivos microbiológicos puede ser recuperado por el presente procedimiento mejorado. Estos incluyen bacterias, hongos y levaduras. En el caso de procedimiento biosintéticos que emplean alimentaciones hidrocarbonadas, se puede utilizar microorganismo que sea capaz de asimilar hidrocarburos.

Aunque el presente procedimiento es aplicable a una amplio número de microorganismos susceptibles de ser tratados, hay nueve microorganismos que son especialmente apropiados para asimilación de hidrocarburos. Estos microorganismos están tubulados seguidamente junto con sus números de registro A.T.C.C. correspondientes, que fueron asegurados depositando muestras en la American Type Culture Collection en Washington, D.C.

30



	<u>Nombre del microorganismo</u>	<u>Número A.T.C.C.</u>
	<u>Micrococcus cerificans</u>	14987
	<u>Pseudomonas ligustri</u>	15522
5	<u>Pseudomonas pseudomallei</u>	15523
	<u>Pseudomonas orvilla</u>	15524
	<u>Alcaligenes sp.</u>	15525
	<u>Cellumonas galba</u>	15526
	<u>Brevibacterium insectiphilium</u>	15528
	<u>Corynebacterium sp.</u>	15529
10	<u>Corynebacterium pourometabolum</u>	15530

Se ha de sobreentender también que las clases y subclases particulares de bacterias utilizadas, están determinadas por la alimentación particular empleada. Por ejemplo, cuando los microorganismos son hechos crecer en metano o en otras alimentaciones parafínicas gaseosas, la clase preferida de microorganismo es la de Pseudomonadaceae, tal como Pseudomonas methanica. Cuando la biosíntesis se realiza utilizando una alimentación de nafta ligera, las clases de microorganismos preferidos son:

20 Pseudomonadaceae y Arthrobacter, tal como Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas desmolyticum, Pseudomonas aeruginosa y Arthrobacter globiforme.

En una realización preferida, la biosíntesis se conduce utilizando un inoculador de bacterias, especialmente bacterias-coccus gram-negativa; pero se pueden emplear levaduras, por ejemplo.

25 Torulopsis magnolia, Candida albicans y Saccharomyces sp.

Aunque se puede emplear cualquier célula bacteriana acrobia capaz de asimilar alimentaciones hidrocarbona-

30

335718



nadas C₁ a C₃₅ normales, las bacterias preferidas son las siguientes:

5 Micrococcus cerificans (Arthrobacter ureafaciens)
Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Nocardia
opaca, Nocardia rubra, Nocardia coralina, Pseudomonas
methanica, Pseudomonas desmolyticum y Mycobacterium phleie.

10 Especialmente preferido es el Micrococcus ceri-
ficans, aislado e identificado por el doctor R.E.Kallio y
otros, Journal of Bacteriology, Volumen 78, núm. 3 páginas
441-448 (Septiembre 1959). Cultivos de este organismos
han sido depositados en la American Type Culture Collec-
tion, 212 M Street, North-West, Wshington 7, D.C. y tiene
el número 14.987. La identificación completa de este
material es la siguiente:

15 Morfología: Las células son pequeñas, esféricas,
y tienden a ser elípticas en cultivos viejos y en medios
de alto contenido en nitrógeno. Células de medios defini-
dos tienen un diámetro medio de 0,5 a 1,0, u y las de me-
dios complejos, diámetros celulares de 1,0 a 2,0 u. Las
20 células aparecen solas o en pellas o masas aglomeradas.

No se observan gránulos Inmoviles, Metacromáticos ni grá-
nulos Sudanofílicos.

La reacción Gram: negativa.

25 Las colonias sobre cultivos de agar definidos
son pequeñas (1 mm), circulares, convexas, teniendo un
reborde completo. Las colonias sobre cultivo de agar nu-
triente son mayores (2 a 5 mm), mucoides salientes, ge -
neralmente redondos.

30 Pigmentación aparecen las variantes blancas,
beige (o gris-pardo) o tostado.



Obligadamente aerobios. Una gran variedad de materiales soportan el crecimiento, extracto de levadura, hidrolizado de caseína, alcoholes y ácidos de cadena larga, alcanos y olefinas normales de cadena larga.

5

Fermentación de carbohidratos; no fermenten carbohidratos. De forma aerobia son asimilados muchos carbohidratos. Estos incluyen glucosa, maltosa, manitol, sacarosa, lactosa, arabinosa, rammosa, sorbitol, dulcitol e inulina. De forma aerobia se utiliza la glucosa con producción de ácido. Ha sido identificado el ácido glucónico.

10

Reducción con nitrato: negativa.

Licuación de gelatina: generalmente negativa.

Puede ocurrir una lenta licuación en algunas cepas.

Hidrólisis con urea: negativa o hidrólisis lenta.

15

Se produce catalasa.

No se utiliza hidrógeno

La temperatura óptima es de 25°C.

El PH de crecimiento óptimo es de 7,0 a 8,5

Manantial: suelo de Iowa

20

Habitat: suelos

Se observa que una identificación más reciente muestra que el organismo es probablemente un Arthrobacter en lugar de un Micrococcus y se parece estrechamente a Arthrobacter ureafaciens. El siguiente resumen de productos indica las razones para la identificación preferida de este organismo como Arthrobacter

25

30

335718



	<u>Micrococcus</u>	<u>M. Cerificans</u>	<u>Arthrobacter</u>
	Siempre gram-positivo. Fermentación rápida.	Siempre gram-negativo	Gram negativo o variable

- | | | | |
|----|--|-------------------------------|---|
| 5 | Células en masas irregulares | Igual que <u>Arthrobacter</u> | Puede ocurrir una formación de filamentos cortos con alguna formación rudimentaria de brotes. |
| | Jamás cambia de tamaño | Igual que <u>Arthrobacter</u> | Pueden aparecer a veces células mayores que las coccoidales usuales. |
| 10 | Jamás aparece en estado de varilla | Igual que <u>Arthrobacter</u> | Grandes células coccoides dan lugar a células en forma de varilla |
| | Los carbohidratos son fermentados frecuentemente | Igual que <u>Arthrobacter</u> | Poco o ningún ácido procedente de carbohidratos. |

El oxígeno es suministrado al medio de cultivo en cualquier forma capaz de ser asimilada fácilmente por el microorganismo inoculador. Se pueden utilizar compuestos que contengan siempre oxígeno siempre que no afecten de forma desfavorable al crecimiento de células de microorganismos y a la conversión de alimentación hidrocarbonada en células de microorganismos. Convenientemente, el oxígeno es suministrado como un gas que contiene oxígeno, por ejemplo aire, que contiene entre aproximadamente 19 y aproximadamente 22% en peso de oxígeno. Aunque es preferible emplear aire, se puede utilizar aire enriquecido con oxígeno que tenga más de 22% en peso de oxígeno. En general entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4,0, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente 2,5 volúmenes, por minuto de aire, son suministrados al reactor, por volumen de líquido de baño de fermentación.

30 El nitrógeno es esencial para la biosíntesis. El



manantial de nitrógeno puede ser cualquier compuesto orgánico o inorgánico que contenga nitrógeno, que sea capaz de desprender nitrógeno en una forma apropiada para la utilización metabólica por el o los microorganismos utilizados. En la categoría, se pueden enumerar los siguientes compuestos como compuestos ilustrativos que contiene nitrógeno que se pueden utilizar: proteínas, proteínas hidrolizadas con ácido, proteínas digeridas con enzimas, aminoácidos, extracto de levadura, asparraguina, urea etc. Por razones de economía, es preferible usualmente emplear un compuesto inorgánico tal como amoníaco, hidróxido de amonio, o sales de los mismos, tales como fosfato de amonio, citrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato ácido de amonio, etc. Un método muy conveniente y satisfactorio de suministrar nitrógeno, consiste en emplear hidróxido de amonio, fosfato de amonio o fosfato ácido de amonio, que puede ser añadido como la sal "per se" o puede ser producido "in situ" en los medios de fermentación acuosos haciendo burbujear gas amoníaco a través del caldo de cultivo, al que se había añadido previamente ácido fosfórico, formando de esta manera fosfato ácido de amonio. De esta manera, se mantiene el margen de pH de 5,0 a 8,5 y se suministra el nitrógeno requerido. El hidróxido de amonio puede ser suministrado al baño de biosíntesis en cantidades entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,0% en peso, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,15% en peso de nitrógeno basado sobre el baño de fermentación total.

Para un crecimiento apropiado de microorganismo es también necesario suministrar las cantidades requeridas

335718

19 MAR 1964

de nutrientes minerales seleccionados al baño de biosíntesis. Así, se incluyen en el medio de crecimiento acuoso, potasio, sodio, hierro, magnesio, calcio, manganeso, fósforo y otros nutrientes. Estos materiales necesarios pueden ser suministrados en la forma de sus sales y preferiblemente de sus sales solubles en agua. Por ejemplo, el potasio puede ser suministrado como cloruro, fosfato, sulfato, citrato, acetado, nitrato de potasio etc. El hierro y el fósforo pueden ser suministrados en la forma de sulfatos y fosfatos, respectivamente, por ejemplo sulfato de hierro y fosfato de hierro. Usualmente, la mayor parte del fósforo es suministrado como fosfato de amonio. Cuando se utilizan fosfato de amonio o fosfato ácido de amonio, pueden servir como manantial combinado de nitrógeno y fósforo (ión-fosfato) para el crecimiento de los microorganismos. La siguiente tabla contiene una tabulación de los iones nutrientes minerales, y sus cantidades convencionalmente empleadas en el medio de crecimiento acuoso

Mineral	Porcentajes en peso de sales en medio acuoso suministradas, basado en el crecimiento de células de concentración de 1% en peso.
H ₃ PO ₄ P	0,01 - 1,0
Na ₂ SO ₃ S & Na	0,01 - 0,5
KCl K & Cl	0,01 - 0,5
MgSO ₄ Mg	0,005- 0,5
CaCl ₂ Ca	0,005- 0,5
FeSO ₄ Fe	0,001- 0,1
MnSO ₄ Mn	0,001- 0,1

En todo lo anterior, los iones indicados pueden ser suministrados como otras sales en cantidades estequiométricamente iguales.

335718



La temperatura a la que se realizan los cultivos microbiológicos puede variar entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 55°C, dependiendo del microorganismo específico que se utiliza; pero usualmente, se emplean temperaturas entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 45°C. Preferiblemente, la fermentación se conduce a temperaturas entre 25°C y aproximadamente 40°C.

El pH medio de crecimiento acuoso es mantenido generalmente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,5. Si el pH resulta demasiado alto, puede ser disminuído fácilmente por la adición de un ácido apropiado a los medios de fermentación, por ejemplo H_3PO_4 . De manera similar, si el pH resulta demasiado bajo, puede ser aumentado por la adición de una base apropiada, por ejemplo amoníaco o hidróxido de amonio.

En el comienzo del cultivo, el medio de crecimiento es inoculado con el microorganismo utilizado, por ejemplo de un inóculo de carga previamente cultivado en el mismo medio en que ha de ser hecho crecer. Se pueden emplear otros procedimiento de inoculación, por ejemplo utilización de un inóculo en el que dicho microorganismo ha sido hecho crecer previamente en un medio diferente de aquel en que ha de ser conducida la fermentación, y después puede ser transferido al recipiente o recipientes de fermentación.

El reactor puede ser agitado durante la biosíntesis por cualquier medio convencional, tal como un agitador de paletas, un agitador del tipo de propulsor, mezclador oscilante, u otros medios agitadores que dispersen completamente el oxígeno, el hidrocarburo, el microorganismo y

335718



los nutrientes de células esenciales. Por ejemplo, se pueden utilizar agitadores de paletas que tengan una potencia de 1 a 100, preferiblemente 5 a 30 CV, por cada 4.400 litros de medio reaccionante líquido. Las velocidades preferidas de agitación con un agitador de paletas son superiores a 1000 r.p.m. preferiblemente a 1500 r.p.m.

El tiempo de permanencia en líquido para bacterias tales como Micrococcus cerificans (Arthrobacter ureafaciens) es, en general de 1 a 10 horas, preferiblemente de 1 a 3 horas, y más preferiblemente de 1,5 a 2,5 horas. Desde luego, el presente procedimiento se puede llevar a cabo por medios continuos o discontinuos.

Ejemplo 1.- Micrococcus cerificans es hecho crecer continuamente en un baño de biosíntesis acuoso, que contiene 1,0% en peso de n-hexadecano como el medio de alimentación hidrocarbonado.

Un procedimiento reactor de biosíntesis de 7,5 litros es cargado con 4 litros de medio de crecimiento acuoso, que contiene 0,10% en peso de bacterias (Micrococcus cerificans) como inculador. Se hace burbujear a través de la suspensión de inculador suficiente aire para satisfacer demanda de oxígeno de las bacterias antes de introducir las alimentaciones hidrocarbonadas y de crecimiento de sales inorgánicas (conteniendo la última ácido fosfórico e hidróxido de amonio). Una composición de baño típico de biosíntesis en una etapa típica dada de biosíntesis continua es la siguiente:

	<u>Componente</u>	<u>Gramos</u>	<u>litros</u>
	n-hexadecano		10
30	H ₃ PO ₄		5

335718



	KCL	1
	CaCl ₂	0,5
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2
	MnSO ₄ , 4 H ₂ O	0,2
5	FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2
	NaCl	0,2
	NH ₄ OH	se añade la cantidad suficiente para mantener un pH 7,0

10 La temperatura de crecimiento en el baño de biosíntesis es mantenida en 35°C, más o menos 2°C, y el pH del baño de biosíntesis es mantenido esencialmente neutro, a saber a un pH de 7,0, más o menos 0,1, a lo largo de la biosíntesis. La conversión de alimentación hidrocarbonada en células es mantenida en 90% y más. Después de un tiempo de permanencia de aproximadamente 2 horas, se retira continuamente del baño de biosíntesis una suspensión acuosa de corriente de producto. Esta suspensión acuosa de corriente de producto contiene aproximadamente 1% en peso de células de bacterias, junto con hidrocarburos que no han sido convertidos, sales inorgánicas, nutrientes, etc.

20 Ejemplo 2.- Experimento 1. Una pequeña columna de vidrio con un orificio de alimentación en el centro, y tomas de salida en la parte superior y en el fondo fue cargada con 30 cm³ de la suspensión acuosa de corriente de producto procedente del reactor de biosíntesis del Ejemplo 1.

25 Se añadieron entonces 10 cm³ de cloruro de metileno (diclorometano) a la columna de vidrio, y se mezclaron a fondo con la suspensión acuosa. La temperatura de mezclado era de aproximadamente 21°C. La aglomeración de las células de microorganismos en el cloruro de metileno se verificó espontáneamente al introducir el cloruro de metileno. Se permitió

30 entonces sedimentarse a la mezcla durante aproximadamente 30 minutos. La mayor parte de la fase acuosa permaneció



como una capa flotante. La fase orgánica resultante fue se-
parada de la fase acuosa y las células de microorganismos
fueron recuperadas por separación, para eliminar cloruro
de metileno y agua ocluída. Se recuperaron sustancialmen-
te todas las células de microorganismos presentes en la
suspensión acuosa original. Aproximadamente el 40% de la
suspensión acuosa original estaba presente en el producto
aglomerado.

5
10
Experimento 2.- Se repitió el procedimiento del
Experimento 1, excepto que se emplearon 30 cm³ de cloruro de
metileno. Sustancialmente todas las células de microorga-
nismos fueron eliminadas de la suspensión acuosa, y aproxi-
madamente 42% de la suspensión acuosa original estaba pre-
sente en el producto aglomerado.

15
20
Experimento 3.- Se repitió el procedimiento del
experimento núm. 1, excepto que se emplearon 90 cm³ de
cloruro de metileno. Sustancialmente todas las células
fueron eliminadas de la suspensión acuosa, y aproximadamen-
te el 50% de la suspensión acuosa original estaba presente
en el producto aglomerado.

15
30
Ejemplo 3.- Se repitió el procedimiento del
Ejemplo 2, Experimento 1, respectivamente, con 10, 30 y 90
cm³ de cloruro de metileno a una temperatura de mezclado
de aproximadamente 43°C. Sustancialmente todas las células
fueron eliminadas de la suspensión acuosa en cada uno de
los tres experimentos. La cantidad de suspensión acuosa
original presente en el producto aglomerado era, respectiva-
mente de aproximadamente 20, 23 y 30% en peso, para los ex-
perimentos que emplearon 10, 30 y 90 cm³ de cloruro de meti-
leno.

335718



Ejemplo 4.- Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2, separadamente con cloroformo, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono y tolueno. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en los Ejemplo 2 y 3 con cada uno de los disolventes empleados en este ejemplo.

Ejemplo 5.- Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2, experimento 1, con acetona, etanol, hexano y Varsol. (un disolvente hidrocarbonado alifático). Ninguno de estos líquidos orgánicos causó aglomeración de las células de productos microbianos, y de esta manera, no realizó la separación de las células desde la suspensión acuosa. La acetona y el etano son miscibles con la suspensión acuosa, mientras que el hexano y el Varsol no mojan preferentemente a los microorganismos.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América con fecha 17 de Enero de 1966 bajo el número 520.858, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención, propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años son los siguientes:

1ª.- Un procedimiento de separar microorganismos, que comprende (a) mezclar (1) un medio acuoso que contiene microorganismos y (2) un líquido orgánico inmiscible

335718



que moja preferentemente a dichos microorganismos, para formar una fase acuosa y una fase orgánica, y (b) separar dichos microorganismos desde dicha fase orgánica.

5 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho mezclado se realiza a una temperatura entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 55°C.

3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho líquido orgánico tiene una densidad mayor que la de dicho medio acuoso.

10 4.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho líquido orgánico es un compuesto alifático halogenado C₁-C₄.

15 5.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho líquido orgánico está seleccionado entre el grupo que consiste en cloroformo, cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono y tolueno.

20 6.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho microorganismo es Micrococcus cerificans.

7.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho líquido orgánico tiene un calor de evaporación menor que el del agua.

25 8.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que la relación volumétrica de dicho líquido orgánico mezclado con dicho medio acuoso está entre aproximadamente 1:20 y aproximadamente 100:1.

30 9.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que la relación volumétrica de dicho líquido orgánico mezclado con dicho medio acuoso es de aproximada-

335718



mente 1:3.

5 10.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho líquido orgánico está en contacto con el medio acuoso durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora.

10 11.- Un procedimiento biosintético en el que un microorganismo es cultivado en un medio de crecimiento acuoso que contiene un manantial de carbono, hidrógeno, oxígeno y nutrientes celulares esenciales, y en el que los microorganismos cultivados son separados de una suspensión acuosa retirada de dicho medio de crecimiento acuoso caracterizado por la mejora que comprende (a) mezclar (1) dicha suspensión acuosa y (2) un líquido orgánico inmisible que moja preferentemente a dichos microorganismos para formar una fase
15 acuosa y una fase orgánica, y (b) separar dichos microorganismos desde dicha fase orgánica.

20 12.- Un procedimiento para separar células de Micrococcus cerificans desde un medio acuoso, que comprende mezclar cloruro de metileno con un medio acuoso que contiene dichas células, a una temperatura de aproximadamente 43°C, para formar una fase acuosa y una fase de cloruro de metileno, y separar dichas células de dicha fase de cloruro de metileno estando la relación volumétrica de cloruro de metileno a medio acuoso entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1.
25

13.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 y 7-11, en que el microorganismo corresponde al número 14.987 del American Type Culture Collection.

30 14.- Un procedimiento de separar microorganismos Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-

335718



9 MAR 1967

cede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas
a máquina por una sola cara,

Madrid,

9 MAR 1967

P.A.

Alberto de Elorza
Por Poder

335718

4.367

VHM.