

CASO SFP. 1870.

17



344475

344475

PATENTE DE INVENCION

por 20 años

por "Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta" - - - - -

a favor de: THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, de nacionalidad británica, domiciliada en Britannic House, Moor Lane, LONDON, E.C.2, Gran Bretaña.

- - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente patente se refiere a un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, totalmente o en parte, de mezclas de dichos hidrocarburos con otros hidrocarburos.

5 En la patente belga 623450 se describe un procedimiento que comprende el cultivo de un linaje de levadura que es adaptado para producirse en hidrocarburos parafínicos de cadena recta, en presencia de fracciones del petróleo que consisten en parte de hidrocarburos de cadena recta y tienen un peso medio molecular que corresponde a lo menos a 10 átomos de carbono por molécula, y en
10 presencia de un medio nutriente acuoso; y en presencia de un gas conteniendo oxígeno libre y separación de la mezcla, por una parte, levadura y, por otra parte, una fracción del petróleo que tie-



- 2 - 344475

ne una reducida proporción de hidrocarburos de cadena recta a que está libre de dichos hidrocarburos de cadena recta. Se ha comprobado que este procedimiento es de particular valía para el tratamiento de fracciones gas oil del petróleo que contienen hidrocarburos de cadena recta en forma de ceras, ya que por el proceso se obtiene un gasoil de punto de fluidez mejorado mientras las ceras son convertidas en un producto valorable.

Según el objeto de la presente patente se suministra un procedimiento que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de una fracción de petróleo que consiste totalmente o en parte de hidrocarburos de cadena recta, en presencia de un medio nutriente acuoso que consiste en parte de fosfato y en presencia de un gas que contiene oxígeno libre, dicha fracción del petróleo y dicho medio acuoso siendo continuamente alimentado por un fermentador que contiene dicho microorganismo y en donde toma lugar una primera etapa de cultivo de dicho microorganismo, un flujo de producto comprendiendo el microorganismo siendo continuamente pasado a una segunda etapa fermentadora, en la cual el microorganismo es tratado con una segunda etapa de medio nutriente acuoso, un flujo de producto comprendiendo microorganismo siendo continuamente separado de la segunda etapa fermentadora, dicho producto siendo tratado para recuperar el microorganismo, en la primera etapa de cultivo la cantidad de fosfato en la fase acuosa de la primera etapa fermentadora siendo tal que la proporción de desarrollo del microorganismo no sea impedida por falta de fosfato, y en la segunda etapa la cantidad de fosfato en la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora siendo menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo del microorganismo o estando ausente el fosfato de la fase acuosa de

344475



la segunda etapa fermentadora.

Si se desea, la segunda etapa de medio nutriente acuoso puede contener o consistir totalmente o en parte del medio nutriente acuoso separado de la primera etapa fermentadora. Si se desea el producto líquido total separado de la primera etapa fermentadora, 5 conteniendo dicho producto, en suspensión, el producto microorganismo, puede ser pasado a la segunda etapa fermentadora.

Se halla comprendido dentro del fin de la presente invención el empleo del reciclado, en la primera etapa y/o en la segunda etapa, 10 de microorganismo y/o hidrocarburo. No obstante de acuerdo con esta invención el material de una etapa cada es reciclado a la misma etapa.

Operando de acuerdo con el procedimiento de la invención se obtienen buenos rendimientos de microorganismo en relación a la 15 cantidad de fosfato empleado.

Por "fosfato" como se usa aquí nosotros queremos decir un fosfato metálico o amónico soluble en agua o un ácido fosfórico o mezcla conteniendo dos o más de tales materiales. De preferencia el fosfato será del tipo convencionalmente empleado en los medios nutrientes acuosos. Los fosfatos preferidos son el trifosfato sódico 20 y el ácido ortofosfórico. La presencia de fosfatos distintos a los indicados no se excluye cuando su presencia es deseable pero la presencia, además, de un "fosfato" como el antes definido debe ser esencial.

Por "cantidad de fosfato" nosotros queremos decir el peso de ion fosfato presente en la fase acuosa. 25

Según otro aspecto de la invención ésta suministra un procedimiento que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de una fracción del petróleo que consiste totalmente o en parte



de hidrocarburos de cadena recta, en presencia de un medio nutriente acuoso que consiste en parte de fosfato y en presencia de un gas que contiene oxígeno libre, dicha fracción del petróleo y dicho medio acuoso siendo continuamente alimentado a un fermentador que contiene dicho microorganismo y en donde toma lugar una primera etapa de cultivo de dicho microorganismo, un flujo de producto comprendiendo el microorganismo y el medio nutriente acuoso siendo continuamente separado de la primera etapa fermentadora y pasado a una segunda etapa fermentadora, un flujo de producto que comprende microorganismo siendo continuamente separado de la segunda etapa fermentadora, en la primera etapa de cultivo la cantidad de fosfato en la fase acuosa de la primera etapa fermentadora siendo tal que la proporción de desarrollo del microorganismo no sea impedida por falta de fosfato, y tal que en la segunda etapa la cantidad de fosfato en la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora es menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo del microorganismo.

Quando operando según uno u otro de los aspectos de la invención antes descritos se prefiere que el nivel de ion fosfato en el medio suministrado a la segunda etapa, en un periodo dado, sea menor que 1 parte por peso, estimada como fósforo elemental por 100 partes por peso de microorganismo (estimada en peso seco) entrando en la segunda etapa fermentadora durante dicho periodo.

Generalmente los hidrocarburos de cadena recta estarán presentes en el material de carga de acuerdo con la invención como parafinas; no obstante, los hidrocarburos de cadena recta pueden estar presentes como olefinas; también puede emplearse una mez-



cla que contenga parafinas yolefinas de cadena recta.

Materiales de carga convenientes para el procedimientos de la invención comprenden las kerosinas, gasoils y aceites lubricantes; estos materiales de carga pueden estar sin refinar o pueden haber pasado algún tratamiento de refinación, pero generalmente se requiere que contengan una proporción de hidrocarburos de cadena recta con el fin del propósito de la invención. Convenientemente se emplea una fracción del petróleo que contiene 3-45% por peso de hidrocarburos de cadena recta.

De preferencia se emplea una fracción del petróleo que consiste total o en parte de hidrocarburos de cadena recta y teniendo un peso molecular medio correspondiendo a lo menos a 10 átomos de carbono por molécula.

El procedimiento de la invención es de particular valor para el tratamiento de fracciones gasoil del petróleo que contienen hidrocarburos de cadena recta en forma de ceras, ya que por el procedimiento de la invención, un gasoil de punto de fluidez mejorado se obtiene mientras las ceras son convertidas en un producto valorable.

En el término "microorganismo" empleado aquí nosotros incluimos la mezclas de microorganismos".

Microorganismos que son cultivados como se ha descrito pueden ser levaduras, mohos, o bacterias.

Las bacterias en esta especificación están clasificadas según el sistema descrito en "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" por R.S. Breed, E.G.D Murray y N.R. Smith (1957) 7 th Edición, publicado por Williams and Wilkins (Baltimore, U.S.A.). Las levaduras están clasificadas de acuerdo con "The Yeasts-a Taxonomic Study" por Lodder and Kreger-van Rij (1952) publicado por



North Holland Publishing Company (Amsterdam).

De preferencia cuando una levadura es empleada esta es de la familia Cryptococcaceae y particularmente de la subfamilia Cryptococcoidae; no obstante, si se desea pueden usarse, por ejemplo, levaduras ascosporogeneas de la subfamilia Saccharomycoidae. El género preferido de la subfamilia Cryptococcoidae es el *Torulopsis* (también conocido como *Torula*), *Candida* y *Mycoderma*. Las especies preferidas de levaduras son como siguen:

En particular es preferido usar las existencias específicas de número de referencia indicado; estos números de referencia referidos a existencias CBS por el Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, Bearn, Holanda y por existencias INRA por el Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Francia.

		Linajes preferidos
15	<i>Candida lipolytica</i>	CBS 599
	<i>Candida pulcherrima</i>	CBS 610
	<i>Candida utilis</i>	CBS 890
	<i>Candida utilis</i> , Variati major	CBS 841
	<i>Candida tropicalis</i>	CBS 2317
20	<i>Candida arborea</i>	
	<i>Torulopsis colliculosa</i>	CBS 133
	<i>Hansenula anomala</i>	CBS 110
	<i>Oidium lactis</i>	
	<i>Neurospora sitophila</i>	
25	<i>Mycoderma cancoillote</i>	INRA: STV 11

De ellas el *Candida lipolytica* es particularmente preferida.

Si se desea, el microorganismo puede ser un moho. Un conveniente linaje es el *Penicillium expansum*.



- 7 - 344475

Si se desea el microorganismo puede ser una bacteria.

Una bacteria conveniente es una del orden:-

Pseudomonadales, Eubacteriales y Actinomycetales.

De preferencia las bacterias que son empleadas son de las
5 familias Corynebacteriaceae, Micrococcaceae, Achromobacteraceae,
Actinomycetaceae, Rhizobiaceae, Bacillaceae y Pseudomonadaceae.
Las especies preferidas son la *Bacillus megaterium*, *Bacillus sub-*
tilis y *Pseudomonas Aeruginosa*.

Otras especies que pueden ser empleadas comprenden:

- 10 *Bacillus amylobacter*
- Pseudomonas natriegens*
- Arthrobacter* sp.
- Micrococcus* sp.
- Corynebacterium* sp.
- 15 *Pseudomonas syringae*
- Xanthomonas begoniae*
- Flavobacterium devorans*
- Acetobacter* sp.
- Actinomyces* sp.
- 20 *Nocardia opaca*

Para el desarrollo del microorganismo será necesario pro-
veer, adicionando al material de carga, un medio nutriente acuoso
y una fuente de oxígeno, de preferencia en forma de aire.

Un medio nutriente conveniente para levaduras (y mohos) tie-
25 ne la composición:



344475

- 8 -

	$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	2 gramos
	KCl	1.15 gramos
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.65 gramos
	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17 gramos
5	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.045 gramos
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.068 gramos
	Agua corriente	200 gramos
	extracto de levadura	0.025 gramos
	agua destilada (a alcanzar los 1000 mls.)	

10 Un medio nutriente típico para el desarrollo de Nocardia tiene la composición siguiente:

	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1 gramo
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20 gramo
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 gramo
15	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002 gramo
	KH_2PO_4	2 gramos
	$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3 gramos
	CaCl_2	0.1 gramo
	Na_2CO_3	0.1 gramo
20	Extracto de levadura	0.008 gramo
	Agua destilada a(alcanzar los 1000 mls.)	

Para otras bacterias un medio nutriente conveniente tiene la composición:

	KH_2PO_4	7 gramos
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 gramo
	NaCl	0.1 gramo
	NH_4Cl	2.5 gramo
	Agua corriente (trazas de elementos)	100 mls .



- 9 - 344475

extracto de levadura 0.025 gramo

Hasta los 1000 mls. con agua destilada.

Otro medio nutriente conveniente para el desarrollo de bacterias tiene la composición

	NH ₄ Cl	0.5 gramo
5	NaCl	4 gramos
	MgSO ₄	0.5 gramo
	Na ₂ HPO ₄	0.5 gramo
	KH ₂ PO ₄	0.5 gramo
	Agua hasta los	1000 mls.

10 El desarrollo del microorganismo empleado es favorecido por la adición al medio de cultivo de una proporción muy pequeña de extracto de levadura (un producto industrial rico en nutrilitos esenciales o factores de desarrollo, obtenidos por la hidrólisis de una levadura) o más generalmente de los nutrilitos esenciales. Los nutrilitos esenciales comprenden la biotina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, tiamina, inositol, y piridoxima. 15 La cantidad de extracto de levadura adicionado es de preferencia del orden de 25 partes por millón. La cantidad de cada nutrilito requerida varía entre cerca 0,1 partes por millón para la biotina a cerca 10 partes por millón para el inositol. 20

De preferencia el medio nutriente acuoso en cada fermentador es mantenido a un deseado pH por la intermitente o continua adición de un medio acuoso de elevado valor pH.

25 La temperatura óptima de la mezcla de desarrollo puede variar según el tipo de microorganismo empleado y se hallará generalmente situada en el orden de los 25-35°C. Cuando se usa Candida lipolytica la temperatura preferida es del orden de 28-32°C.

La toma de oxígeno es esencial para el desarrollo del microorganismo. El oxígeno debe generalmente ser provisto como aire.



344475

- 10 -

De la segunda etapa fermentadora es separado un flujo de producto que contiene microorganismo e hidrocarburos no metabolizados en una fase continua acuosa.

5 La mayor parte de la fase continua acuosa es primero separada; de preferencia esto se efectúa por centrifugación. La fase acuosa separada generalmente contendrá una elevada concentración de iones no nutritivos que pueden ser tolerados en el flujo de reciclado y cuando esto es así, solamente una proporción de la fase acuosa recuperada puede ser reciclada. Así será generalmente posible
10 separar hasta 96% por peso de la fase acuosa que está presente en el producto de la cual en el mismo porcentaje base hasta 20% por peso será descargada. El flujo reciclado es suministrado con cantidades de ajuste de los nutrientes necesarios y es devuelta al fermentador; si se desea los materiales de ajuste pueden ser alimentados al fermentador por un flujo separado.
15

El procedimiento como aplicado al cultivo de una levadura, puede incorporar etapas de separación de producto como sigue. En algunos casos microorganismos distintos a levaduras pueden ser separados de esta manera.

20 En primer lugar debe generalmente ser posible separar el microorganismo, contaminado con algún material de carga no metabolizado y medio nutriente acuoso, de la masa de la fracción de material de carga no metabolizado.

25 La fracción microorganismo, generalmente en la forma de una pasta o crema y conteniendo hidrocarburos como impurezas, es sometido a lavado por medio de una solución acuosa de un agente surfactante. De preferencia la fracción microorganismo es vigorosamente mezclada con el agente surfactante acuoso, y, privado de un ulterior periodo de desarrollo del microorganismo, es some-



tido a una adicional separación, de preferencia por centrifugación, para recuperar una fracción de microorganismo y una consumida fase acuosa que contiene impurezas hidrocarburos separada del microorganismo. Si es necesario, las etapas de lavado y separación pueden repetirse, otra vez, usando un agente surfactivo acuoso en la etapa del lavado. Después del lavado con el agente surfactivo es necesario lavar con un medio acuoso que esté libre de agente surfactivo; de preferencia este medio será agua. Aún si se desea, una serie de etapas de lavado y separación pueden emplearse.

De preferencia las etapas de lavado son efectuadas hasta que el contenido hidrocarburo del microorganismo es menor que 7% basado en el peso del microorganismo (como calculado en estado seco). De preferencia dicho contenido de hidrocarburos debe ser menor que 5%.

Como agente surfactivo empleado para el lavado se pueden usar agentes surfactivos catiónicos tal como cloruro amónico de esteariltrimetilo, agentes surfactivos no-iónicos, por ejemplo los condensados de ácido oleico y óxido de etileno, o agentes surfactivos aniónicos, por ejemplo alchilsulfatos de sodio.

La fracción que contiene el microorganismo es entonces de preferencia sometida a extracción disolvente. De preferencia la extracción disolvente es efectuada por el uso de un disolvente que consiste de o que contiene un hidrocarburo. De preferencia el hidrocarburo tiene 4-7 átomos de carbono por molécula. De preferencia el hidrocarburo es una parafina y de preferencia, la parafina es una parafina de cadena recta: El pentano normal y el hexano normal son disolventes convenientes.



- 12 - 344475

Si se desea la extracción de los hidrocarburos por medio de un disolvente hidrocarburo es precedida por la extracción por medio de un alcohol, de preferencia etanol.

5 Si se desea se puede usar una etapa de extracción usando, como disolvente, una mezcla de un hidrocarburo con, por ejemplo, etanol. Así se puede usar un disolvente consistiendo de 80% en peso de hexano y 20% en peso de etanol.

10 Los hidrocarburos recuperados en la fase de extracción por extracción disolvente, aún metabolizables, puede ser reciclada a la etapa de cultivo del microorganismo.

Una levadura que ha sido libertada de la totalidad o parte de sus lípidos y los hidrocarburos contaminadores por uno de los métodos descritos antes y cuyo gusto ha sido mejorado es un nuevo producto industrial de valor para la nutrición humana.

15 Según una forma preferida de esta invención se suministra un proceso que comprende el cultivo de un microorganismo en una manera como la antes descrita en presencia de una fracción de petróleo que consiste en parte de hidrocarburos de cadena recta y que tiene un peso molecular medio que corresponde a lo menos
20 a 10 átomos de carbono por molécula, y en presencia de un medio nutriente acuoso; y en presencia de un gas que contiene oxígeno libre, y separación de la mezcla, por una parte, del microorganismo y, por otra parte, de una fracción del petróleo que tiene una proporción reducida de hidrocarburos de cadena recta o que está
25 libre de dichos hidrocarburos de cadena recta y después de eso tratamiento del microorganismo como antes se ha descrito.

Los métodos preferidos para usar en el cultivo del microorganismo y para la recuperación del producto se describen en las patentes británicas números 914567 y 914.568 entre otras, y en la



francesa número 924.254.

La invención es ilustrada sin carácter alguno limitativo con referencia al siguiente Experimento y Ejemplos 1 y 2. El Experimento se aporta con el propósito de comparación.

EXPERIMENTO

5 La levadura *Candida tropicalis* fué desarrollada en una operación continua en un primer fermentador de 60 metros cúbicos de capacidad en presencia de un medio nutriente acuoso teniendo la composición siguiente:

		<u>gramos/litro</u>
	(NH ₄) ₂ H PO ₄	2.0
10	KCl	1.15
	Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.65
	Mn SO ₄ 4H ₂ O	0.068
	Fe SO ₄ 7H ₂ O	0.124
	Zn SO ₄ 7H ₂ O	0.308
15	Extracto de levadura	0.03

con aeración a la proporción de 30 v/v/4. empleando agitación torbellinó.

La fuente de carbono fué suministrada por un gasoil obtenido de petróleo bruto Irak y teniendo las características siguientes:

20	Gravedad específica	0.870
	Temperatura de fluidez	+ 15°C
	Orden de ebullición	300-390°C

Una mezcla de gasoil y medio nutriente acuoso en proporciones relativas de 1,5:10 partes por volumen fué alimentada al fermentador a la proporción de 200 litros por metro cúbico de fermentador



tador por hora (que es 12000 litros por hora). El fermentador fué mantenido a 30°C y a un pH de 4 por admisión continua de amoniaco acuoso.

5 Un flujo de producto fué apartado continuamente y separado, 1400 litros por hora se pasaron a un decantador y 12000 litros por hora se pasaron a un segundo fermentador de 30 metros cúbicos de capacidad.

10 En el decantador un flujo acuoso de 2000 litros por hora fué separado y descargado y el flujo restante reciclado continuamente al primer fermentador.

15 El segundo fermentador fué mantenido a 30°C y aerado a la proporción de 30 v/v/4 empleando un agitador de torbellino la fuente de carbono fresco fué suministrada siendo abastecida por hidrocarburos residuales conducidos del primero al segundo fermentador.

Un flujo de corriente fué continuamente descargado del segundo fermentador y sometido a decantación. Luego 66% en peso de la fase acuosa fué separada y reemplazada por 66% en peso de agua corriente.

20 0.5 Kg de detergente no iónico, vendidos bajo la marca NI 29 y siendo el producto obtenido por condensación de una mezcla de alcohol myristico y laurico con óxido de etileno, fueron adicionados por cada metro cúbico de la mezcla de levadura, aceite residual y agua.

25 Esta mezcla fué agitada totalmente y centrifugada en un autoyector Scharples DG 2 centrífugo para obtener como productos separados:



una pasta de levadura; una fase acuosa y una fase gasoil.

La pasta de levadura fué después mezclada nuevamente con agua corriente a una proporción de 1 parte por peso de materia seca por 5 partes por peso de agua y totalmente separada y cen-
5 trifugada por segunda vez.

La pasta de levadura recuperada, contenía 65 a 70% de agua. Algo de agua fué separada para producir una crema consis-
tiendo de 50% de levadura (peso seco) y 50% por peso de agua.

Esta levadura humedecida fué luego bombada dentro de un ex-
10 tractor que estaba en la forma de tambor filtrante y era rotati-
vo con su eje horizontal.

Una mezcla disolvente consistiendo de 50% por peso de hexa-
no normal y 50% de isopropanol fué adicionada a la levadura hú-
meda a una proporción de 8 partes por peso de mezcla por parte
15 de levadura (peso seco). La mezcla de levadura, agua y disolven-
te fué mantenida a 50°C durante 30 minutos. Luego el disolvente
conteniendo la mayor parte de las impurezas de la levadura fué
separado.

El restante producto de levadura fué otra vez tratado con
20 disolvente en una segunda etapa de extracción a base de 1 parte
por peso de levadura seca por 1 parte de agua por 4 partes de
una mezcla de 50% por peso de hexano normal y 50% de isopropa-
nol, estando en contacto durante 30 minutos a 50°C. Después de
la filtración del disolvente cargado con algunas impurezas de
25 la levadura, el producto restante fué tratado en una segunda
etapa de extracción con 2 partes por peso de una mezcla disol-
vente consistiendo de:



- 16 - 344475

una pasta de levadura; una fase acuosa y una fase gasoil.

La pasta de levadura fué después mezclada nuevamente con agua corriente a una proporción de 1 parte por peso de materia seca por 5 partes por peso de agua y totalmente separada y cen-
5 trifugada por segunda vez.

La pasta de levadura recuperada, contenía 65 a 70% de agua. Algo de agua fué separada para producir una crema consistiendo de 50% de levadura (peso seco) y 50% por peso de agua.

Esta levadura humedecida fué luego bombada dentro de un ex-
10 tractor que estaba en la forma de tambor filtrante y era rotativo con su eje horizontal.

Una mezcla disolvente consistiendo de 50% por peso de hexa- no normal y 50% de isopropanol fué adicionada a la levadura húme- da a una proporción de 8 partes por peso de mezcla por parte de
15 levadura (peso seco). La mezcla de levadura, agua y disolvente fué mantenida a 50°C durante 30 minutos. Luego el disolvente conteniendo la mayor parte de las impurezas de la levadura fué separado.

El restante producto de levadura fué otra vez tratado con
20 disolvente en una segunda etapa de extracción a base de 1 parte por peso de levadura seca por 1 parte de agua por 4 partes de una mezcla de 50% por peso de hexano normal y 50% de isopropanol, es- tando en contacto durante 30 minutos a 50°C. Después de la filtra- ción del disolvente cargado con algunas impurezas de la levadura,
25 el producto restante fué tratado en una segunda etapa de extrac- ción con 2 partes por peso de una mezcla disolvente consistiendo de:

n-hexano	80% por peso
isopropanol	20% por peso



La mezcla fué mantenida a 50°C durante 10 minutos y el disolvente apartado, finalmente bajo vacío. El lavado con esta mezcla disolvente fué repetido 4 veces. Finalmente el producto levadura fué secado con vapor supercalentado.

5 Los datos de operación y resultados obtenidos se muestran en la Tabla siguiente:

Ejemplo 1

El procedimiento descrito en el Experimento fué repetido con un cambio en la concentración del fosfato en los medios de suministro a los dos fermentadores.

10 (a) El medio de alimentación al primer fermentador fué obtenido por dilución del medio nutriente acuoso descrito en el Experimento con un volumen igual de agua. El extracto de levadura fué ajustado a 0.03 gramos/litro.

(b) No se empleó reciclo de crema de levadura.

15 Las condiciones y resultados obtenidos se muestran en la Tabla siguiente.

Ejemplo 2

20 El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 fué repetido con un cambio en la concentración de fosfato en los medios de suministro a los dos fermentadores.

25 El medio alimentado al primer fermentador fué obtenido por dilución de 1 volumen del medio nutriente acuoso descrito en el Experimento con 2 volúmenes de agua. El extracto de levadura fué ajustado a 0.03 gramos/litro. No se empleó reciclo de crema de levadura.

Las condiciones de operación y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla siguiente:



18 344475

- 18 -

T A B L A

344475



	Experimento		Ejemplo 1		Ejemplo 2	
	Fermentador (1)	Fermentador (2)	Fermentador (1)	Fermentador (2)	Fermentador (1)	Fermentador (2)
Proporción de dilución	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4
pH	4	5.30	4	5.30	4	4.30
Temperatura						
Proporción de gasoil fresco alimentado	120	-	120	-	120	-
Proporción de aereación	30	30	30	30	30	30
Reciclo de crema						
% de la crema decantada	50	-	-	-	-	-
Medio nutriente fresco						
CO						
Fósforo (1)	0.44	0.23	0.26	0.11	0.15	0.03
Densidad celular	9.8	13.0	8.4	11.0	8.4	9.0
Medio usado						
Fósforo (1)	0.23	0.17	0.11	0.07	0.03	0.02
Lavado						
Punto de fluidez del Gasoil	+ 3	- 7	- 2	- 6	- 2	- 5
Análisis de la levadura						
base seca						
Total de lípidos	0.5	0.5	0.3	0.4	-	-
Nitrógeno	8.4	8.6	9.2	10.2	-	-
Contenido de fósforo (1)	2.1	2.0	1.8	1.5	1.6	1.1

(1) Estimado como fósforo elemental
‡ No estimado



344475

		Experimento		Ejer
		Fermentador: (1)	Fermentador: (2)	Fermentador: (1)
Proporción de dilución	vol/vol/hora	0.2	0.4	0.
pH		4	5.5	4.
Temperatura	°C	30	30	.
Proporción de gasoil fresco alimentado	gramos/litro	120	-	1.
Proporción de aeración	vol/vol/hora	30	30	.
Reciclo de crema	% de la crema decantada	50	-	.
Medio nutriente fresco				
<u>Fósforo (1)</u>	gramos/litro	0.44	0.23	0
<u>Densidad celular</u>	gramos/litro	9.8	13.0	8
<u>Medio usado</u>				
<u>Fósforo (1)</u>	gramos/litro	0.23	0.17	0
<u>Lavado</u>				-
Punto de fluidez del gasoil	°C	+ 3	- 7	-
<u>Análisis de la levadura</u>				
	base seca			
<u>Total de lípidos</u>	"	0.5	0.5	0
Nitrógeno	"	8.4	8.6	9
Contenido de fósforo (1)	"	2.1	2.0	1

(1) Estimado como fósforo elemental
 † No estimado



18 No. 344475

Ejemplo 1		Ejemplo 2	
Fermentador (1)	Fermentador (2)	Fermentador (1)	Fermentador (2)
0.2	0.4	0.2	0.4
4	5.5	4	4
30	30	30	30
120	-	120	-
30	30	30	30
-	-	-	-
0.26	0.11	0.15	0.03
8.4	11.0	8.4	9.0
0.11	0.07	0.03	0.02
-	-	-	-
- 2	- 6	- 2	- 5
0.3	0.4	=	=
9.2	10.2	=	=
1.8	1.5	1.6	1.1



- 19 - 344475

5 Bajo las condiciones ilustradas en el Experimento el nivel de fosfato en el medio nutriente acuoso en el primero y segundo fermentadores fué adecuado para soportar, en ambos fermentadores, un desarrollo del microorganismo no dificultado por merma de fosfato.

10 Bajo las condiciones ilustradas en los Ejemplos 1 y 2 el nivel de fosfato en el medio nutriente acuoso en el primer fermentador fué adecuado para soportar el desarrollo del microorganismo, no dificultado por merma de fosfato, y el nivel de fosfato en el medio nutriente acuoso en el segundo fermentador fué tal que el desarrollo del microorganismo fué impedido por merma de fosfato.

15 Bajo las condiciones ilustradas en el Ejemplo 1, la limitación del desarrollo fué marginal en el segundo fermentador y hubo un substancial nivel de fosfato en el consumo de medio nutriente acuoso del segundo fermentador. (No obstante este nivel es menor que aquel del medio usado del primer fermentador). No obstante, una notable reducción en el nivel de fósforo en el microorganismo recuperado se ha observado. Así la producción de microorganismo por unidad de fósforo incorporado a éste es más elevada con respecto al producto del segundo fermentador que con respecto al producto del primer fermentador.

20 Bajo las condiciones ilustradas en el Ejemplo 2 el nivel de fosfato en el consumo del medio nutriente acuoso es bajo, como es el contenido de fósforo del microorganismo derivado de la segunda etapa fermentadara.

NOTA



Un tercer ejemplo es aportado a continuación para mayor comprensión.

Ejemplo 3

5 La levadura Hansenula fué desarrollada lentamente en un primer fermentador operado de forma continua de 60 litros de capacidad en presencia de un medio nutriente acuoso teniendo la composición siguiente:

	<u>gramos/litro</u>
	(NH ₄) ₂ PO ₄ H 1.0
	KCl 0.58
10	MgSO ₄ , 7H ₂ O 0.32
	MnSO ₄ , 4H ₂ O 0.034
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O 0.15
	FeSO ₄ , 7H ₂ O 0.061
	Extracto de levadura 0.15

15 con una proporción de aireación de 30 volúmenes por volumen por hora usando agitación en torbellino.

El substrato de carbono fué suministrado por un gasoil obtenido de petróleo bruto Iraq teniendo las siguientes características:

20	Gravedad específica 60°F/60°F	0.867
	Indice de refracción n _D ²⁰	1.484
	Temperatura de enturbamiento	+13°C
	Temperatura de flúidez	+11°C
	Azufre (total)	1.59% por peso



5 La mezcla de gasoil y medio nutriente acuoso en la proporción relativa 1.5 : 10 partes por volumen fué alimentada al fermentador a razón de 12 litros por hora. El fermentador fué mantenido a 30°C y a pH₄ por admisión continua de amoniaco acuoso.

Una corriente de producto de 12 litros por hora fué continuamente separado y pasado a un segundo fermentador de 30 litros de capacidad.

10 El segundo fermentador fué mantenido a 30°C y aireado a la proporción de 30 volúmenes por volumen por hora usando agitación torbellino. El sustrato de carbono no fresco fué sustituido, la fuente de carbono suministrándose por hidrocarburos residuales conducidos desde el primero al segundo fermentador.

15 Una corriente de producto fué continuamente descargada desde el segundo fermentador y sometida a decantación. Luego 70% por peso de la fase acuosa fué separada y reemplazada por 10% por peso de agua corriente.

20 1 gramo de detergente no-iónico de alcohol láurico oxitilenatado vendido bajo la marca denominada NI 29 fué adicionado por litro de la mezcla de levadura, petróleo residual y agua. Esta mezcla fué agitada a fondo y centrifugada en un supercentrifugador Sharples para obtener: una pasta de levadura, una fase acuosa y una fase gasoil.

25 La pasta de levadura fué después remezclada con agua corriente a una proporción de 1 parte por peso de materia seca por 5 partes por peso de agua y agitada a fondo y centrifugada otra vez. El contenido del agua en la levadura fué entonces ajustado a 50% por peso. Esta levadura hi-



meda fué luego bombeada dentro un extractor que estaba en forma de un filtro de tambor el cual fué rodado con su eje horizontal. Una mezcla disolvente consistiendo de 50% por peso de n-hexano y 50% de isopropanol fué adicionada a la levadura húmeda a una proporción de 8 partes por peso de mezcla por parte de levadura (base seca). La mezcla de levadura, agua y disolvente fué mantenida a 80°C durante 1 hora, luego el disolvente conteniendo la mayor parte de las impurezas de la levadura fué separada.

Un segundo tratamiento disolvente en la misma base como se ha indicado antes fué dado a la levadura restante. Después de la eliminación del disolvente cargado con las impurezas de la levadura, el producto de levadura húmeda restante fué otra vez tratado con disolvente en una segunda etapa de extracción en la base de 1 parte por peso de levadura seca por 4 partes de isopropanol produciéndose el contacto durante 30 minutos a 60°C.

El disolvente fué separado y finalmente el producto de levadura fué secado con vapor supercalentado.

Los datos de operación y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla siguiente:

T A B L A.



T A B L A 344475

		Fermentador (1)	Fermentador (2)
Proporción de dilución	vol/vol/horas	0.2	0.4
pH		4	5.5
temperatura	°C	30	30
Gas-oil fresco			
Proporción de alimentación	gramos/litro	120	nada
Proporción de aireación	vol/vol/hora	30	30
Medio nutriente fresco			
fósforo	gramos/litro	0.26	0.10
densidad celular	gramos/litro	8.5	11.8
Medio usado			
fósforo	gramos/litro	0.10	0.03
Desparafinado			
Punto de enturbiamiento del gas-oil por gas-oil	°C	+2	-6
Análisis de la levadura			
total de lípidos	%	0.8	0.7
nitrógeno	%	8.2	10.5
Contenido de fósforo	%	2	1.7



Por la patente de invención a que se refiere la presente memoria descriptiva se REIVINDICA la propiedad y la explotación exclusiva de:

5 1.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, caracterizado por el hecho que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de una fracción del petróleo que consiste totalmente o en parte de hidrocarburos de cadena recta, en presencia de un medio nutriente acuoso que consiste en parte de fosfato y en presencia de un gas conteniendo oxígeno libre, dicha fracción del petróleo y dicho medio acuoso siendo continuamente alimentado a un fermentador que contiene dicho microorganismo y en el cual toma lugar una primera etapa de cultivación de dicho microorganismo, pasándose continuamente un flujo del producto comprendiendo el microorganismo a una segunda etapa fermentadora, en la cual el microorganismo es tratado con una segunda etapa de medio nutriente acuoso, siendo continuamente separado un flujo del producto comprendiendo microorganismo de la segunda etapa fermentadora, en la primera etapa de cultivo la cantidad de fosfato en la fase acuosa en la primera etapa fermentadora siendo tal que la proporción de desarrollo del microorganismo no es impedida por merma de fosfato, y en la segunda etapa la cantidad de fosfato en la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora siendo menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo del microorganismo o estando ausente el fosfato de la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora.

25 2.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el



especificado en 1, caracterizado por el hecho que la segunda etapa de medio nutriente acuoso contiene o consiste toda o en parte del medio nutriente acuoso separado de la primera etapa fermentadora.

5 3.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, caracterizado por el hecho que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de una fracción de petróleo que consiste total o en parte de hidrocarburos de cadena recta, en presencia de un medio nutriente acuoso que consiste en parte de fosfato y en presencia de un gas que contiene oxígeno libre, dicha fracción de petróleo y dicho medio acuoso siendo continuamente alimentado a un fermentador que contiene dicho microorganismo y en el cual toma lugar una primera etapa de cultivo de dicho microorganismo, siendo continuamente separado de la etapa fermentadora un flujo de producto que comprende el microorganismo y medio nutriente acuoso y pasado a una segunda etapa fermentadora, un flujo de producto que comprende microorganismo siendo separado continuamente de la segunda etapa fermentadora, siendo en la primera etapa de cultivo la cantidad de fosfato en la fase acuosa en la primera etapa fermentadora tal que la proporción de desarrollo del microorganismo no es impedido por merma de fosfato, y tal que en la segunda etapa la cantidad de fosfato en la fase acuosa en la segunda etapa fermentadora es menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo del microorganismo.

4.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones preceden-



tes, caracterizado por el hecho que el producto líquido total separado de la primera etapa fermentadora, conteniendo dicho producto, en suspensión, el producto microorganismo, es pasado a la segunda etapa fermentadora.

5 5.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que en la primera etapa hay un reciclo de parte del microorganismo y/o a lo menos parte del
10 hidrocarburo que ha sido separado de la etapa.

6.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que en la segunda etapa hay un reciclo de parte del microorganismo.
15

7.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el microorganismo es un microor-
20 ganismo que consume hidrocarburo parafínico de cadena recta.

8.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganism-
mo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una le-
25 vadura.

9.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en 8, caracterizado por el hecho que la levadura es de la familia Cryptococcaceae.



10.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo, y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en 9, caracterizado por el hecho que la levadura es de la subfamilia Cryptococcoideae.

5 11.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en 10, caracterizado por el hecho que la levadura es del género *Torulopsis*.

10 12.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en 10, caracterizado por el hecho que la levadura es del género *Candida*.

15 13.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en 11, caracterizado por el hecho que la levadura es *Candida lipolytica*.

20 14.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en 11, caracterizado por el hecho que la levadura es *Candida tropicalis*.

15.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en las reivindicaciones 1-7, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una bacteria.

25 16.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que las fracciones del petróleo consisten, totalmente o en parte, de hidrocarburos de cadena recta y tie-



nen un peso molecular medio que corresponde a lo menos a 10 átomos de carbono por molécula.

5 17.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que la fracción del petróleo es un gasoil.

10 18.- Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta, caracterizado por el hecho que el medio nutriente acuoso abastecido, en un periodo dado a la segunda etapa fermentadora, contiene, fosfato en una cantidad menor que 1 parte por peso, estimado en fósforo elemental, por 100 partes por peso de microorganismo estimado en peso seco, introducido dentro del fermentador en dicho periodo.

15 19.- "Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo y la separación de hidrocarburos de cadena recta".

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

Barcelona, 17 de Agosto de 1967.

...ALBO