

P.- 38.638

U.S. 667.750

21 JUL 1968

356699

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de ESSO RESEARCH AND ENGINEERING COMPANY

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en Elizabeth, Nueva Jersey, Estados Unidos de América

por: "PROCEDIMIENTO DE FERMENTACION AEROBIA MEJORADO PARA LA PRODUCCION DE UN PRODUCTO CON ALTO CONTENIDO DE PROTEINAS" (Clase Internacional C12d A23j)

=====

1.7.68.



El presente invento concierne de forma general a un procedimiento de fermentación por biosíntesis. Más particularmente, el invento concierne a la utilización de hidrocarburos oxigenados, particularmente hidrocarburos oxigenados solubles en agua, en calidad de manantial principal de carbono en el procedimiento. De acuerdo con una adaptación específica del presente invento, fracciones hidrocarbonadas, tales como líquidos y gases de petróleo, son oxidadas u oxidadas parcialmente, y acto seguido son puestas en contacto con un microorganismo bajo condiciones de fermentación para producir altos rendimientos de proteínas. El procedimiento puede llevarse a cabo de forma continua o discontinua.

La actual escasez mundial de proteínas, especialmente de proteínas animales de bajo costo, para el consumo por parte de animales y de seres humanos, es bien conocida. En un intento de aliviar esta escasez de proteínas, se han desarrollado recientemente varios procedimientos de biosíntesis en los que se crean proteínas producidas biológicamente por el crecimiento de microorganismos sobre diversos materiales de substrato que contienen carbono. Una de dichas técnicas implica hacer crecer diversos microorganismos, tales como levaduras y bacterias, sobre substratos de carbohidrato. Sin embargo, esta técnica depende de la disponibilidad de grandes cantidades de carbohidratos relativamente costosos que aumentan significativamente el coste del procedimiento y de producto.

Otra técnica reciente, e incluso más prometedor, para sintetizar biológicamente proteínas alimenticias, consiste en cultivar los microorganismos sobre substratos

30
1.7.68.



de petróleo. Este tipo de síntesis de proteínas por fermentación se conduce usualmente en un baño de biosíntesis acuoso que contiene una alimentación hidrocarbonada, un agente de inoculación del microorganismo que ha de ser hecho crecer, un medio de crecimiento acuoso, oxígeno, nitrógeno y otros nutrientes indispensables. Esta técnica permite la utilización de alimentaciones hidrocarbonadas, que se encuentran ampliamente disponibles en las cantidades necesarias y son menos costosas que los carbohidratos. También es conocido utilizar diversos catalizadores biológicos en procedimientos de fermentación. El procedimiento de biosíntesis del presente invento es aplicable a la biosíntesis de todos los microorganismos que son capaces de crecer sobre substratos hidrocarbonados oxigenados, particularmente los substratos oxigenados derivados de fracciones hidrocarbonadas del petróleo.

Aunque el presente invento es aplicable a un amplio margen de microorganismos susceptibles de ser utilizados, existe un cierto número de microorganismos que son especialmente apropiados para la asimilación de hidrocarburos oxidados. Estos microorganismos están tabulados seguidamente (tablas I y II) junto con sus números de identificación tales como los números de registro A.T.C.C., que fueron fijados depositando muestras en American Type Culture Collection, 212 M Street, Northwest, Washington 7, D. C.; los registros CBS, que se refieren a la materia prima conservada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda; o los números de registro de Quartermaster Culture Collection, que se refieren a muestras conservadas en Natick, Massachusetts. La Tabla II enumera un cierto

30
1.7.68.

31



número de géneros de levaduras que son especialmente apropiados para la asimilación de hidrocarburos oxidados. Estas especies de levaduras están enumeradas también con números de identificación.

1.7.68.

TABLA I - BACTERIAS

1	Division	Clase	Orden	Familia	Tribu	Género	Especie	Número
2	Protophyta	Schizomycetes	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		ligustri	ATCC 15522
3							pseudomallei	ATCC 15523
4							orvilla	ATCC 15524
5			Eubacteriales	Micrococcaceae	Micrococcus		cerificans	ATCC 14987
6					Sarcina		sp	QME1518 Natick
7				Brevibacteriaceae	Brevibacterium		insectiphilium	ATCC 15528
8							healii	ATCC 15527
9				Achromobacteraceae	Alcaligenes		sp	ATCC 15525
10				Corynebacteriaceae	Cellulomonas		galba	ATCC 15525
11					Corynebacterium		sp	ATCC 15529
12							psurometabolum	ATCC 15530
13					Arthrobacter		simplex	ATCC 6946
14							sp	ATCC 19140
15			Actinomycetales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium		rhodochrous	ATCC 15808
16				Actinomycetaceae	Nocardia		sp	
17							sp	

TABLA I - BA

1	<u>Division</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>	!
2	Protophyta	Schizomycetes	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	—
3					
4					
5			Eubacteriales	Micrococcaceae	—
6					
7				Brevibacteriaceae	—
8					
9				Achromobacteraceae	—
10				Corynebacteriaceae	—
11					
12					
13					
14					
15			Actinomycetales	Mycobacteriaceae	—
16				Actinomycetaceae	—
17					

1.7.68.



31

LA I - BACTERIAS

<u>Tribu</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>	<u>Número</u>	
ceae	Pseudomonas	ligustri	ATCC 15522	
		pseudomallei	ATCC 15523	
		orvilla	ATCC 15524	
ceae	Micrococcus	cerificans	ATCC 14987	
	Sarcina	sp	QMB1518 Natick	
ceae	Brevibacterium	insectiphilium	ATCC 15528	
		healii	ATCC 15527	
ceae	Alcaligenes	sp	ATCC 15525	
ceae	Cellumonas	galba	ATCC 15526	
		Corynebacterium	sp	ATCC 15529
			paurometabolum	ATCC 15530
		Arthrobacter	simplex	ATCC 6946
sp	ATCC 19140			
ceae	Mycobacterium	rhodochrous	ATCC 13808	
ceae	Nocardia	sp		
		sp		



TABLA II - LEVADURAS

1	Division	Clase	Orden	Familia	Subfamilia	Tribu	Genero
2	Thallophyta	Ascomycetes	Endomycetales	Endomycetaceae	Saccharomycetoideae	Endomycopseae	Endomycopsis
3						Saccharomyceteae	Saccharomyces
4							Hansenula
5							Pichia
6							Debaryomyces
7						Nadsonieae	Nadsonia
8					Nematosporoideae		Nematospora
9					Lipomycetoidaeae		Lipomyces
10					Cryptococcaceae		Cryptococcus
11							Torulopsis
12							Brettanomyces
13							Candida
14							Kloeckera
15							Trigonopsis
16					Trichosporoideae		Trichosporon
17					Rhodotoruloideae		Rhodotorulla

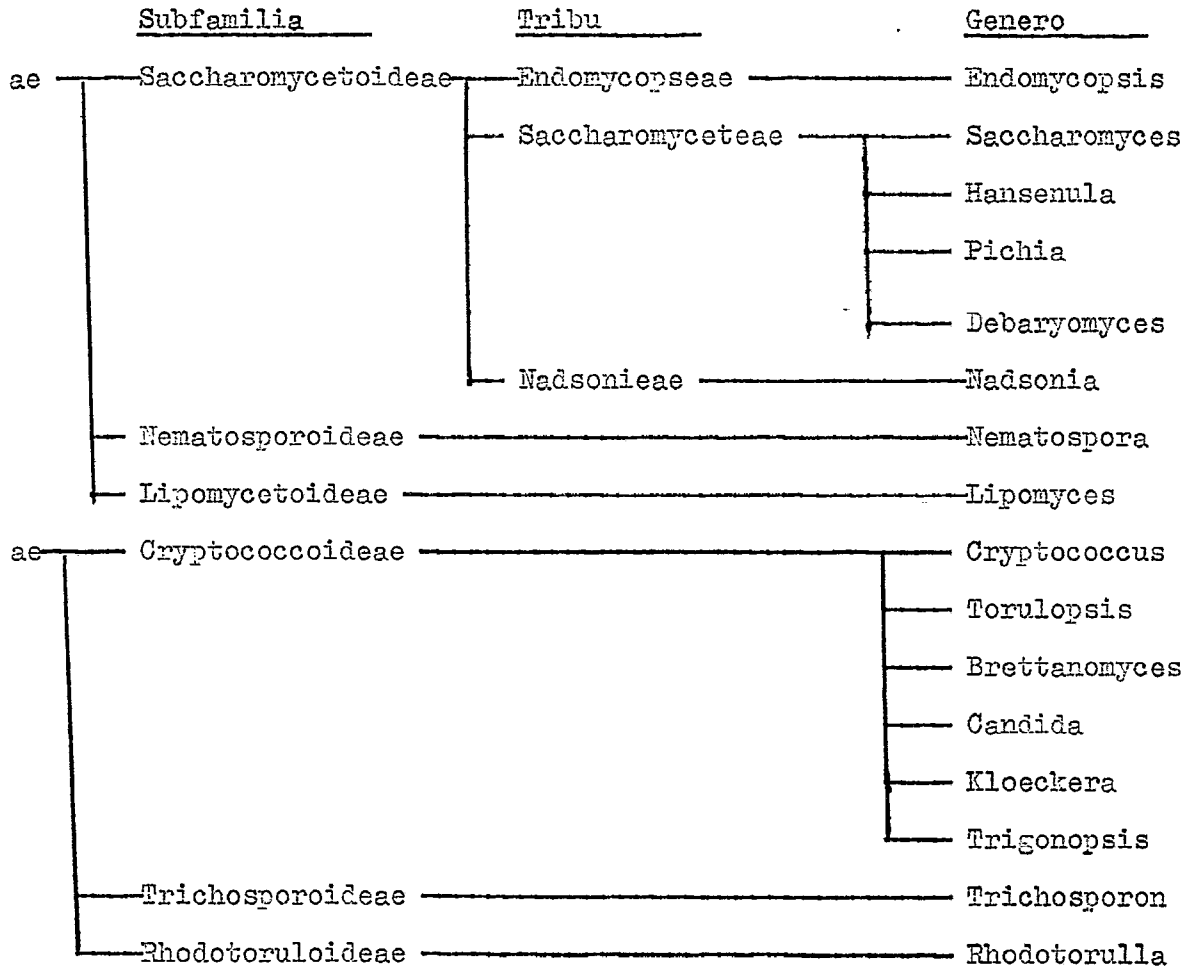
TABLA II -

1	<u>Division</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>
2	Thallophyta	Ascomycetes	Endomycetales	Endomycetaceae
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10		Fungi imperfecti	Cryptococcales	Cryptococcaceae
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				

1..7..68.



II - LEVADURAS



31 JUL



TABLA II - LEVADURAS (Continuación)

	<u>Género</u>	<u>Especie</u>	<u>Cultivo #</u>
	(1) Endomycopsis	capsularis	ATCC # 2471
		fibuliger	ATCC # 2080
5		javanensis	ATCC # 10628
		mali	
		bispora	
	(2) Saccharomyces	cerevisiae (A)	CBS
		rouxii	ATCC # 2624
10		exiguus	ATCC # 10599
		marxianus	ATCC # 10606
		logos	ATCC # 10603
		willianus	ATCC # 10598
		uvarum	ATCC # 10613
15		fragilis	ATCC # 10022
		lactis	ATCC # 10689
		rosei	ATCC # 10664
		chevalieri	ATCC # 10604
		fermentati	ATCC # 2551
20		acidifaciens (B)	ATCC # 8766
		fructuum	ATCC # 13053
		elegans	ATCC # 13053
	(3) Hansenula	anomala (D)	CBS
		saturnus	ATCC # 2579
25		suaveolens	ATCC # 9847
		schneggii	
		californica	ATCC # 10680
		subpelliculosa	ATCC # 14462
		mrakii	NRRL Y-12
30		silvicola	CBS
		minuta	CBS

1.7.68.



TABLA II (Continuación)

	(4) <i>Pichia</i>	<i>membranaefaciens</i>	ATCC # 10649
		<i>farinosa</i>	ATCC # 2252
		<i>polymorpha</i>	ATCC # 15132
5		<i>fermentans</i>	ATCC # 10651
	(5) <i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	ATCC # 2357
		<i>kloeckeri</i>	ATCC # 10620
		<i>subglobosus</i>	CBS
		<i>vini</i>	CBS
10		<i>nicotianae</i>	ATCC # 9364
	(6) <i>Nadsonia</i>	<i>fulvescens</i>	ATCC # 10645
		<i>elongata</i>	ATCC # 10644
	(7) <i>Nematospora</i>	<i>coryli</i>	ATCC # 10647
	(8) <i>Lipomyces</i>	<i>stakeyi</i>	ATCC # 12659
15	(9) <i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	ATCC # 11239
		<i>laurentii</i>	ATCC # 9981
		<i>albious</i>	ATCC # 10666
		<i>luteolus</i>	ATCC # 10671
	(10) <i>Torulopsis</i>	<i>bolmii</i>	ATCC # 10670
20		<i>molischiana</i>	
		<i>dattila</i>	ATCC # 10691
		<i>sphaerica</i>	ATCC # 13193
		<i>candida</i>	ATCC # 2560
		<i>famata</i>	ATCC # 12790
25		<i>stellata</i>	ATCC # 10673
		<i>sake</i>	ATCC # 14478
		<i>globosa</i>	CBS
		<i>versatilis</i>	CBS
		<i>anomala</i>	CBS
30		<i>inconspicua</i>	CBS

1.7.68.

31



TABLA II - (Continuación)

	(11) <i>Brettanomyces</i>	<i>bruxellensis</i>	ATCC # 10560
		<i>lambicus</i>	ATCC # 10563
		<i>anomalus</i>	ATCC # 10559
5		<i>claussenii</i>	ATCC # 10562
	(12) <i>Candida</i>	<i>mycoderma</i>	ATCC # 10641
		<i>pulcherrima</i> (F)	ATCC # 9889
		<i>krusei</i>	ATCC # 2159
		<i>mesenterica</i>	ATCC # 10569
10		<i>tropicalis</i>	ATCC # 1369
		<i>pseudotropicalis</i>	ATCC # 2540
		<i>guilliermondii</i> (H)	ATCC # 9390
		<i>humicola</i>	ATCC # 14438
		<i>rugosa</i>	ATCC # 10571
15		<i>zeylanoides</i>	ATCC # 10674
		<i>pelliculosa</i>	ATCC # 2149
		<i>utilis</i>	ATCC # 9226
		<i>lipolytica</i> (E)	ATCC # 8662
		<i>parapsilosis</i>	ATCC # 7333
20		<i>stellatoidea</i>	ATCC # 11006
		<i>robusta</i>	
		<i>scotti</i>	ATCC # 10572
		<i>curvata</i>	ATCC # 10567
		<i>claussenii</i>	CBS
25		<i>solani</i>	ATCC # 14440
		<i>melibiosii</i>	CBS

1.7.68.



TABLA II - (Continuación)

	(13) Kloeckera	apiculata	ATCC # 10634
		africana	ATCC # 10632
		corticis	ATCC # 10635
5		javanica	ATCC # 10636
		lafarii	ATCC # 10638
		magna	ATCC # 10640
	(14) Trigonopsis	variabilis (C)	CBS # 1040
	(15) Trichosporon	pullulans	ATCC # 10677
10		cutaneum	ATCC # 14255
		infestans	CBS
		sericeum	ATCC # 10678
		capitatum	ATCC # 10663
		fermentane	ATCC # 10675
15		behrendii	ATCC # 14465
	(16) Rhodotorulla	glutinis (G)	ATCC # 2527
		rubra	ATCC # 9449
		mucilaginosa	ATCC # 2503
		aurantiaca	ATCC # 10657
20		minuta	ATCC # 10658

El *Micrococcus cerificans* (14.987), que fue aislado e identificado por el Dr. R. E. Kallio y otros, *Journal of Bacteriology*, volumen 78, número 3, páginas 441-448 (Septiembre 1959), es particularmente deseable. La identificación adicional es la siguiente:

Morfología.

Las células son pequeñas, esféricas, tendiendo a ser elípticas en cultivos viejos y en medios de alto contenido de nitrógeno.

30
1..7.68.

31 JUL 1968

Las células procedentes de los medios definidos tienen un diámetro medio de 0,5 a 1,0 micras, y a partir de medios complejos los diámetros de célula son en promedio de 1,0 a 2,0 micras. Las células aparecen solas o en montones. No se observan gránulos inmotos, metacromáticos ni gránulos pseudanofílicos.

Reacción Gram.- Negativa

Las colonias sobre agar definido son pequeñas (1 mm), convexas circulares, teniendo bordes enteros. Las colonias sobre agar nutriente son mayores (2 a 5 mm), mucoides salientes, generalmente redondas.

Dentro de una especie puede haber muchas cepas diferentes que comprenden variaciones y mutantes tanto naturales como inducidos.

La morfología y las características de reacción de crecimiento de otros organismos antes enumerados están dadas en la patente USA 3.308.035, concedida el 7 de marzo de 1967, con el título "Process for Producing a High Protein Composition by Cultivating Microorganisms on an N-Aliphatic Hydrocarbon Feed", inventor John D. Douros, Jr.

Los medios de crecimiento comprenden un medio de sal mineral acuosa y oxígeno en exceso. El oxígeno es suministrado al medio de substrato de cultivo o caldo de cultivo en cualquier forma capaz de ser asimilada con facilidad por el microorganismo inoculador. También se pueden utilizar compuestos que contienen oxígeno para suministrar oxígeno, siempre que no afecten de forma desfavorable al crecimiento de las células del microorganismo y a la conversión de la alimentación hidrocarbonada oxidada en

30
1.7.68.



células de microorganismos. El oxígeno puede ser suministrado como un gas que contiene oxígeno, tal como aire a presión atmosférica o a presión elevada o aire enriquecido con oxígeno en que la concentración de oxígeno puede ser hasta de 70 a 90%. En general, se suministran al reactor entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10, preferiblemente entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente 2,5 volúmenes por minuto, de aire por volumen de líquido en el fermentador.

El nitrógeno es esencial para el crecimiento biológico. 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 utilización metabólica por el microorganismo en crecimiento. Compuestos nitrogenados orgánicos apropiados son, por ejemplo, proteínas, proteínas hidrolizadas con ácido, proteínas digeridas con enzima, amino-ácidos, extractos de levadura, asparraguina y urea. Compuestos nitrogenados inorgánicos apropiados son amoníaco, hidróxido de amonio, ácido nítrico o sales de los mismos tales como fosfato de amonio, citrato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y pirofosfato ácido de amonio. Un método muy conveniente y satisfactorio de suministrar nitrógeno al procedimiento consiste en emplear hidróxido de amonio, fosfato de amonio o fosfato ácido de amonio, que pueden ser añadidos en forma de la sal propiamente dicha o que pueden ser producidos "in situ" en los medios de fermentación acuosos haciendo borbotear gas amoníaco o amoníaco gaseoso a través del caldo de cultivo, o inyectando hidróxido de amonio acuoso dentro del caldo de cultivo al que se añadió previamente

30
1.7.58.



ácido fosfórico, formando de esta manera fosfato ácido de amonio. De esta manera, se mantiene el margen deseado de pH de aproximadamente 3,0 a 8,5 y se suministra el nitrógeno requerido. Si el microorganismo comprende una levadura, el pH preferido está dentro del margen de 3,0 a 7,5, por ejemplo entre 4,0 y 5,0. Si el microorganismo comprende una bacteria, el pH deseado está dentro del margen de 5,0 a 8,5, por ejemplo de aproximadamente 7,0. Se puede suministrar hidróxido de amonio al baño de biosíntesis en cantidades de entre aproximadamente 0,08 y aproximadamente 0,20, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,15 gramos de nitrógeno por gramo de células secadas producidas. Este asciende a entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,0% en peso, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,15% en peso, de nitrógeno basado en el baño de biosíntesis total.

Además del oxígeno y del nitrógeno, es necesario suministrar cantidades requeridas de nutrientes minerales seleccionados al medio de alimentación con el fin de asegurar un apropiado crecimiento del microorganismo y hacer máxima la asimilación de los hidrocarburos oxidados por las células del microorganismo. Potasio, sodio, hierro, magnesio, calcio, manganeso, fósforo, y otros nutrientes están incluidos en el medio de crecimiento acuoso. Estos materiales necesarios pueden ser suministrados por cualquier técnica, pero preferiblemente son suministrados por sus sales solubles en agua.

El potasio puede ser suministrado en forma de cloruro de potasio fosfato de potasio, sulfato de potasio, citrato de potasio, acetato de potasio y nitrato de pota-

1.7.68.



sio. El hierro y el fósforo pueden ser suministrados en la forma de sus sulfatos y fosfatos, tales como sulfato de hierro y fosfato de hierro. Usualmente, la mayor parte del fósforo es suministrada en forma de fosfatos de amonio.

5 Cuando se utilizan fosfato de amonio o fosfato ácido de amonio, sirven como un manantial combinado tanto de nitrógeno como de fósforo para el crecimiento de las células del microorganismo.

10 Una composición satisfactoria para los medios de fermentación, particularmente para bacterias al principio de la fermentación, es la siguiente:

Concentración (gramos por litro)

Componente	Se puede utilizar	Usualmente se utiliza	Preferiblemente se utiliza
15 Hidrocarburos oxigenados	4-120	5-80	10-50
K_2HPO_4	0,5-15	1-10	2-8
$(NH_4)HPO_4$	5-15	7-13	8-12
Na_2SO_4	0,1-1,0	0,2-0,9	0,3-0,8
20 $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,002-0,5	0,005-0,04	0,01-0,03
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,1-0,7	0,2-0,6	0,3-0,5
$MnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,002-0,05	0,005-0,04	0,01-0,03
NaCl	0,002-0,05	0,005-0,04	0,01-0,03
25 Agua	El resta hasta formar 100% en peso		

Otros nutrientes minerales opcionales, que se pueden incluir en cantidades muy pequeñas, incluyen:



Concentración (miligramos por litro)

Componente	Se puede utilizar	Usualmente se utiliza	Preferiblemente se utiliza
ZnSO ₄ · H ₂ O	0-0,4	0-0,3	0-0,2
5 Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0-0,06	0-0,05	0-0,04
CoCl ₂	0-1,2	0-1,1	0-1,2
H ₃ BO ₃	0-0,08	0-0,07	0-0,06
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0-0,3	0-1,25	0-0,2
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0-0,14	0-0,13	0-0,12
10 NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0-0,01	0-0,008	0-0,006

Desde luego, los nutrientes esenciales y opcionales pueden ser suministrados en la forma de otras sales o ácidos distintos de los anteriormente tabulados.

15 Un medio muy satisfactorio es preparado de la siguiente manera:

Medio P₁

Gramos/litro de agua corriente

(NH ₄) ₂ HPO ₄	10
20 K ₂ HPO ₄	5
Na ₂ SO ₄	0,5

A lo anterior se añaden 10 cm³/litro de una solución de sal A, preparada de la siguiente manera:

<u>Solución de sal A</u>	<u>Gramos/litro de agua destilada</u>
MgSO ₄ · 7H ₂ O	40
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2
NaCl	2

30 El precedente medio P₁ tiene un pH de 7,8. Una
1.7.68.



variante del anterior es una en que se suministra fosfato en la forma de ácido fosfórico.

Medios muy satisfactorios para levaduras son los I, II y III que tienen las siguientes composiciones:

5

Medio I

<u>Compuesto</u>	<u>Gramos/litro de agua corriente</u>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,5
KH_2PO_4	3,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0
NaCl	0,5
NH_4NO_3	5,0
pH ajustado a 6,5	

10

15

20

El medio II es el mismo que el medio I, excepto que se añade 0,001% de extracto de levadura en calidad de factor de crecimiento. El medio III es el mismo que el medio I excepto que se añaden 2 ppm. de biotina en calidad de factor de crecimiento. Se añaden factores de crecimiento al medio básico con el fin de aumentar la velocidad de crecimiento de las diversas levaduras.

25

Los microorganismos, cuando son cultivados primeramente sobre hidrocarburos oxigenados como manantial principal de carbono, crecen algunas veces con dificultad, y algunas veces es necesario utilizar un inóculo de un microorganismo que ha sido adaptado previamente para el crecimiento sobre el substrato que se pretende utilizar. Además, los microorganismos, particularmente levaduras, aunque sean cultivados en la presencia de un medio mineral acuoso que contenga los elementos nutrientes apropiados, pueden crecer con dificultad a causa de que el cul

30

1.7.68.



tivo no contiene los factores de crecimiento que existen en substratos de carbohidrato, a menos que se añadan estos factores de crecimiento.

5 El crecimiento de las levaduras utilizadas es favorecido por la adición al medio de cultivo de cantidades muy pequeñas de extracto de levadura (un producto rico en nutrilitas esenciales, es decir factores de crecimiento obtenidos por la hidrólisis de una levadura) o, más generalmente, de las nutrilitas esenciales. Las últimas in-
10 cluyen biotina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, tiamina, inositol y piridoxina. La cantidad de extracto de levadura añadido es preferiblemente del orden de 25 partes por millón con referencia al medio de fermentación acuoso. Puede ser mayor o menor, según las condiciones escogidas
15 para el crecimiento. También puede ser necesario, en el caso de algún microorganismo, tener presente en el medio de crecimiento una pequeña cantidad de un agente antiespumante.

20 La temperatura del baño de biosíntesis puede variar entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 55°C, dependiendo del microorganismo específico que está siendo hecho crecer, pero las temperaturas preferidas cuando se utilizan bacterias están entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 45°C, por ejemplo, son de aproximadamente 35°C.
25 El pH está preferiblemente dentro del margen desde 5,5 hasta 8,5, por ejemplo de aproximadamente 7,0.

30 Cuando se utiliza una levadura, la temperatura está dentro del margen de aproximadamente 20°C a 47°C, dependiendo del microorganismo específico que está siendo hecho crecer, pero las temperaturas preferidas están dentro
1.7.68.



del margen desde aproximadamente 20°C hasta 40°C, por ejemplo son de 30°C. El pH está dentro del margen de 3,0 a 7,5, y el preferido es de 4,0 a 5,0, por ejemplo de aproximadamente 4,5.

5

En el tipo de procedimiento de fermentación descrito que utiliza hidrocarburos, uno de los factores más difíciles es que los hidrocarburos son insolubles en agua y, por lo tanto, se requieren altas energías de mezclado o emulsificadores químicos, o ambas cosas a la vez, para mantener bien dispersada a la fase hidrocarbonada.

10

Esto es esencial si se han de obtener altas velocidades de fermentación o grandes rendimientos de células. También, en el procedimiento se desprende una cantidad considerable de calor que ha de ser eliminada preferiblemente con el agua de refrigeración disponible en un grado muy ineficaz.

15

Muchas de estas desventajas en que se incurre cuando se utilizan hidrocarburos de cadena recta son eliminadas, y el procedimiento es hecho considerablemente más flexible, utilizando en calidad de alimentación un material hidrocarbonado parcialmente oxidado que puede comprender un alcohol, tal como etanol, o una mezcla de alcoholes, aldehidos, cetonas, ésteres, éteres y ácidos. Estos materiales que contienen oxígeno son atacados por los diversos microorganismos con mayor facilidad que los hidrocarburos no oxidados. Tal como se ha mencionado, una ventaja del presente procedimiento consiste en que, como la conversión de hidrocarburos en compuestos oxidados se desarrolla con el desprendimiento de calor y, como estos compuestos oxidados son compuestos intermedios del procedimiento de fermentación, el calor de la reacción desprendido en la conver-

30

1.7.68.



sión previa es eliminado en un margen de temperaturas deseablemente alto, antes del procedimiento de fermentación. Esto puede dar como resultado una disminución neta muy deseable de aproximadamente 10 a 30% del calor desprendido, así como de las exigencias de aire en el procedimiento de fermentación, basado en una materia prima de alimentación C_6 . Otras ventajas de la utilización de substratos que contienen oxígeno consiste en la reducción de las necesidades de energía de mezclado, debido a la solubilidad mejorada de los substratos y a las reducidas exigencias de aire.

El manantial de carbono, preferiblemente el único manantial de carbono, para el procedimiento de fermentación, es un hidrocarburo oxigenado distinto de los carbohidratos, azúcares, almidones y celulosa. Los hidrocarburos oxigenados deberán suministrar más de aproximadamente 50% del carbono requerido, preferiblemente deberán suministrar más de aproximadamente 80% del carbono requerido, y más preferiblemente la totalidad del carbono requerido. Los hidrocarburos oxigenados pueden comprender alcoholes, cetonas, aldehidos, ésteres y ácidos, preferiblemente los compuestos que contienen desde aproximadamente 1 a 50 átomos de carbono en la molécula que se obtienen oxidando una fracción de petróleo. Los hidrocarburos oxigenados preferidos son los obtenidos a partir de una fracción de petróleo que contiene desde aproximadamente 2 a 20 átomos de carbono en la molécula. Un compuesto deseable está seleccionado de alcoholes que contienen desde aproximadamente 2 a 10 átomos de carbono en la molécula, particularmente alcohol etílico.

El presente invento puede ser comprendido más

30
1.7.68.



completamente haciendo referencia a los dibujos que ilustran una realización del mismo. Refiriéndose a los dibujos, una alimentación hidrocarbonada, tal como nafta ligera o una fracción C_{12} a C_{18} , es introducida en la zona de oxidación 10 por medio de la conducción 1. En esta técnica descrita, la zona de oxidación es hecha trabajar a una temperatura elevada con una baja conversión por ciclo. La oxidación puede ser catalítica o no catalítica y puede realizarse, si así se desea, en la presencia de ácido bórico libre o de compuestos de óxido de boro, que favorecen la formación de alcoholes en la zona de oxidación. En el último caso, una etapa de hidrólisis y de eliminación de ácido bórico precede a la etapa de extracción de alcohol que seguidamente se describirá. Se introduce aire por medio de la conducción 2. La temperatura está dentro del margen de aproximadamente 121°C a 204°C , por ejemplo es de aproximadamente 163°C . La presión de la zona 10 está dentro del margen de $1,05 \text{ kg/cm}^2$ manométrico hasta $17,5 \text{ kg/cm}^2$ manométricos, por ejemplo, es de aproximadamente $8,75 \text{ kg/cm}^2$ manométricos.

Los productos de reacción de la operación de oxidación son retirados de la zona 10 por medio de la conducción 3 y son introducidos en una zona de extracción 20. Los productos de reacción contendrán aproximadamente 10 a 15% de productos oxidados que son extraídos con una gran cantidad de agua, que es introducida en la zona 20 por medio de la conducción 4. La cantidad de agua utilizada está dentro del margen de 1 a 90 volúmenes de agua tal como, por ejemplo, de 3 a 15 volúmenes de agua, por ejemplo aproximadamente 9 volúmenes de agua, por volumen de producto

30
1.7.68.

31 JUN 1968

parcialmente oxidado introducido por medio de la conducción 3. El disolvente de extracción introducido por medio de la conducción 4 puede ser agua pura pero, preferiblemente, es una solución nutriente que se describe anteriormente. Se puede añadir suficiente cantidad de base, tal como amoníaco, por medio de la conducción 5, preferiblemente antes de la extracción, para neutralizar completamente cualesquiera ácidos que estén presentes en la solución.

Como los compuestos oxigenados son muchísimo más solubles en agua que los hidrocarburos de cadena recta, la extracción con agua eliminará selectivamente todos los productos de la oxidación desde la mezcla de reacción. Los hidrocarburos que no se han convertido son retirados de la zona 20 por medio de la conducción 6 y son recirculados preferiblemente a la zona de oxigenación 10 por medio de la conducción 7. El extracto es retirado de la zona 20 por medio de la conducción 8 y es introducido en la zona de fermentación 30. Se pueden añadir agua y sales de reposición para proporcionar las condiciones deseadas para la fermentación, por medio de la conducción 15.

Bajo ciertas condiciones, puede ser deseable introducir el extracto en la zona 40 por medio de la conducción 9 y separar el extracto, con aire que es introducido por medio de la conducción 11 y es retirado por medio de la conducción 13. Este aire puede ser utilizado acto seguido para fines de oxidación en la zona 10. Los productos separados son retirados de la zona 40 por medio de la conducción 12 y son introducidos en la zona de fermentación 30 por medio de la conducción 8. El producto proteínico es retirado de la zona 30 por medio de la conducción 14. La

30
1.7.68.



5 cosecha de las células de producto desde el caldo de cultivo de fermentación puede realizarse por medios apropiados, por ejemplo, en dos etapas. Primeramente, las células pueden ser separadas del líquido flotante por centrifugación (por ejemplo en cubeta cerrada), en ciclones de líquido, (o hidrociclones) por evaporación (por ejemplo, en película descendente, en película deslizante), por filtración (por ejemplo microporos, diálisis, osmosis inversa), por floculación, por sedimentación y por decantación (por

10 ejemplo añadiendo floculantes, coagulantes o agentes auxiliares de filtración, o cambiando el pH o la temperatura), o cualquier otro método o combinación de métodos de separación. Las células concentradas separadas pueden ser secadas acto seguido por secado por pulverización, por secado en tambor, por secado por congelación, por secado en vacío, por secado en bandeja, por secado en estufa, o por

15 cualquier otro procedimiento o combinación de procedimientos de secado. Cualquiera de las anteriores operaciones que se utilice para la separación y el secado de las células de producto, se deberá hacer observar que este procedimiento es extremadamente rentable por el hecho de que no se requiere una separación compleja especial ni lavado con

20 agentes tensioactivos, para eliminar los substratos que no han reaccionado y los subproductos, (aunque pueden ser utilizados éstos en los aspectos más amplios de este invento), para obtener un producto final que tenga un contenido extremadamente alto de proteínas y no tenga ninguna impureza perjudicial para los seres humanos o para los animales.

25

30
1.7.68.

La oxidación previa de los hidrocarburos alimentados al procedimiento de fermentación produce una mez-



cla de alcoholes, aldehidos, cetonas, éteres, y compues-
tos afines de ácido y de éster. Esto reduce la pérdida de
materia prima de alimentación en el aire de fermentación
y disminuye también el tiempo de fermentación. Para un nú-
5 mero dado de átomos de carbono, los compuestos oxigenados
tienen una presión de vapor mucho más baja que los corres-
pondientes hidrocarburos. Además, debido a su alta solubi-
lidad en agua, los compuestos oxigenados solo ejercen una
pequeña fracción de su presión total de vapor cuando están
10 presentes en forma de solución acuosa diluída, mientras que
los hidrocarburos ejercen esencialmente toda su presión de
vapor incluso en concentración baja, debido a su extremada-
mente baja solubilidad en agua. Como resultado de ello,
el aire de fermentación que pasa a través del caldo de cul-
15 tivo de fermentación arrastrará mucho menor cantidad de
hidrocarburos oxigenados que de hidrocarburos ordinarios,
si ambos están presentes en cantidades equivalentes en el
caldo de cultivo de fermentación. Esto no solamente da lu-
gar a una fuerte reducción de las pérdidas, hasta 0 si el
20 aire saliente es lavado con agua o con una solución acuosa,
sino que también elimina esencialmente la posibilidad de
fuego y de explosión, siempre presente cuando el aire y
los hidrocarburos se mezclan en ciertas proporciones.

Así, la presente técnica reduce la carga de
25 calor en el fermentador desde aproximadamente 10 a 30%.

Así, el concepto amplio del presente invento
consiste en utilizar materiales oxigenados, tales como gas
natural oxigenado y fracciones de petróleo hidrocarbonadas
oxigenadas que hierven hasta aproximadamente 4329C, y par-
ticularmente las que contienen desde aproximadamente C₁ a

30
1.7.68.



C_{30} átomos de carbono. Estos compuestos están seleccionados de alcoholes, ésteres, aldehidos, cetonas y ácidos. Compuestos oxigenados preferidos son los alcoholes, especialmente alcohol etílico. Otros compuestos oxigenados de seables son, por ejemplo, alcohol isopropílico, metil-etil-cetona, ácido acético, glicoles, alcohol butílico, acetona, octanol, ácido decanoico, éter dibutílico del ácido sebácico, y adipato de dimetilo. Alcoholes apropiados son metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, alcoholes primarios C_4-C_{30} , de cadena recta o ramificada, 2-etilhexanol, alcohol isoocílico, glicol, glicerina, ciclohexanol, alcoholes secundarios C_4-C_{30} a partir de alimentaciones de parafinas normales o isoparafínicas, monoetoxilatos de alcoholes secundarios, y alcohol crotilico (alcohol C_4 insaturado). Cetonas y aldehidos apropiados son acetona, MEC (metil etil cetona), MIBC (metilisobutilcetona), isoborona, ciclohexanona, ciclopentanona, aldehido estearico, aldehido laurico, acetaldehido y crotonaldehido (aldehido C_4 insaturado). Acidos apropiados son ácido acético, ácido propiónico, ácido caproico, ácido cáprico, ácido laurico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido prauídico, ácido toluico, ácido oxálico, ácido sebácico, ácido tereftálico, ácido ftálico, ácido malónico, ácido hexahidromelítico, y ácido crotonico (ácido C_4 insaturado). Esteres apropiados son acetato de metilo, acetato de etilo, butirato de etilo, estearato de etilo, diacetato de glicol, valerato de isopropilo, ftalato de dimetilo, trioleato de glicerilo y acetato de alcohol C_{12} secundario, y éteres apropiados son etoxilatos, dietil éter, tetrahidrofurano y diisopropil éter.

1.7.68.



Los gases de petróleo, tales como metano, etano, propano y butano, pueden ser oxidados con aire para formar alcoholes, cetonas, aldehidos, éteres y ácidos, por métodos convencionales, tales como la técnica de sólidos rociados, o en un reactor de lecho relleno. Tal como se menciona, los substratos oxidados se derivan preferiblemente de fracciones hidrocarbonadas que contienen desde aproximadamente C₁ a C₃₀ átomos de carbono, especialmente las que tienen desde aproximadamente C₁ a C₅ átomos de carbono. Se ha de sobreentender que se pueden utilizar otras técnicas y procedimientos para fabricar material oxigenado a partir de hidrocarburos C₁ a C₃₀.

Entra también dentro del concepto del presente invento utilizar una fracción oxigenada cruda tal como una fracción cruda que tiene la siguiente composición:

Mezcla A - Compuestos oxigenados

	Alcohol metílico	56,6%
	Acetona	29,0
	Alcohol etílico	8,1
20	Acetato de etilo	2,7
	Acetato de metilo	2,0
	Dimetil propano	0,4
	Alcohol ter-butílico	0,3
	Metil etil cetona	0,3
25	Metil isopropenil cetona	0,3
	H ₂ O	0,3

El invento se puede comprender más completamente mediante los siguientes ejemplos que ilustran adaptaciones del mismo.

1.7.63.

31



Ejemplo 1

Un cierto número de operaciones continuas de fermentación aerobia se realizaron utilizando medios P_1 y utilizando alcohol etílico como el único manantial de carbono. La temperatura fue de 35°C y el pH fue controlado a un valor de 7,0 por la utilización de hidróxido de amonio. Las exigencias de energía eran menores de 9,2 CV/1000 litros de caldo de cultivo, debido a la solubilidad del etanol en el medio de fermentación. También, las exigencias de oxígeno eran menores de 2 gramos por gramo de células que resultan de la utilización de hidrocarburos oxigenados. Se obtuvieron rendimientos de aproximadamente 0,6 gramos de células por gramo de etanol. Los resultados están enumerados en la siguiente tabla.

5

10

1.7.68.

1.7.68.

TABLA III

Operación	Tiempo de permanencia, horas	Velocidad de crecimiento g/l/hora	% de EtOH en la alimentación	Rendimiento g de células/g de EtOH
1	2,0	8,3	2,2	0,60
2	1,5	10,5	2,6	0,59
3	1,5	10,3	2,6	0,55





De esta manera, un procedimiento continuo trabajará con un margen bajo de energía.

5 Con la utilización de una fracción hidrocarbónica C_{16} , se pueden lograr velocidades de crecimiento similares con este bajo consumo de energía solo por la adición de enormes cantidades de oxígeno, a saber de aproximadamente 3 veces la cantidad de oxígeno que se requirió con etanol (véase Ejemplo 4). Esta disminución de utilización de oxígeno para el caso de un hidrocarburo lineal es debida a la resistencia aumentada a la transferencia de masa realizada por la presencia de una fase hidrocarbonada adicional.

10 Ejemplo 2.

15 Se condujeron operaciones adicionales de fermentación continua aerobia, tal como se describe con respecto al ejemplo 1 utilizando un medio P_1 y utilizando también aproximadamente 2% de etanol o de una mezcla de parafinas en las diversas operaciones. Los resultados de estas operaciones están enumerados en la siguiente tabla.

1.7.68.



TABLA IV

Composición de células secadas, % en peso

	Manantial de carbono	Total de proteínas (Nx6,25)	Total grasas	Cenizas
5	Etanol	76,6	4,0	4,15
	Etanol	78,7	6,0	4,20
	Etanol	77,0	5,4	5,33
	Etanol	78,8	3,8	3,96
10	Etanol	78,5	3,3	4,15
	Etanol	80,6	3,1	-
	Etanol	85,6	5,6	-
	Parafina ^(x)	66,5	12,1	4,98
	Parafina ^(x)	65,6	15,0	4,10
15	Parafina ^(x)	61,8	17,4	4,70
	Parafina ^(x)	68,0	19,9	4,14
(x) Mezcla de parafinas de cadena recta, % en peso				
20	C ₁₃	1,6		
	C ₁₄	4,8		
	C ₁₅	32,3		
	C ₁₆	29,8		
	C ₁₇	22,6		
25	C ₁₈	8,1		
	C ₁₉	0,8		
		100,0		
Menos de 0,01% de aromáticos.				
30	A partir de lo anterior, es evidente que cuan-			
1.7.68.				



do se utiliza etanol, se obtienen rendimientos apreciablemente mayores de proteína. También, el contenido de grasas es disminuído drásticamente.

Ejemplo 3.

5 Se condujeron operaciones adicionales de fermentación aerobia continua en que se efectuaron comparaciones utilizando la alimentación parafínica descrita en el Ejemplo 2 y etanol. Las comparaciones se efectuaron con una energía relativamente baja de 7,95 CV/1000 l y con
10 una energía relativamente alta de 26,5 CV/1000 litros. Se utilizó aproximadamente 2% en peso de etanol o de una mezcla de parafinas en un medio P₁.

Los resultados de estas operaciones están indicados en la tabla siguiente.

1.7.68.

1.7.68.

TABLA V

Comparación de fermentaciones en etanol y de parafinas.

CV/1000 Ltros.	Substrato	Velocidad de crecimiento g/l-hora	Selectividad		Conc. de O ₂ en aire, %
			g de células/ substrato de alimen tación	g de células/ g de C en el substrato.	
7,95	EtOH	8,1	0,70	1,34	41,0
7,95	Parafina	10,5	0,59	1,13	57,0
26,5	EtOH	10,7	0,71	0,83	70,8
26,5	Parafina	11,2	0,94	1,10	49,5
		9,3	0,71	0,83	53,0



TABLA V (Continuación)

CV/1000 litros	Substrato	% de O ₂ uti- lizado %	Análisis de células secas						H ₂ O aproxi- mado %
			0%	N%	Cenizas %	Total de grasas %	Amino ácidos %		
7,95	EtOH	48,0	47,5	11,2	2,4	8,7	60	4,5	
		52,7	44,9	12,5	4,7	3,2	55	7,2	
7,95	Parafina	35,9	50,3	11,0	2,9	16,0	48	10,3	
		36,8	55,4	8,1	24,8	20,6	34	4,6	
26,5	EtOH	49,0	47,0	11,9	3,2	4,7	52	3,2	
		57,0	44,7	12,4	7,0	4,7	52	4,5	
26,5	Parafina	45,7	46,2	9,4	3,6	8,6	49	4,4	
		51,0	50,4	10,7	5,9	22,1	47	10,1	





A partir de lo que antecede, es evidente que se obtienen resultados deseables inesperados cuando se utiliza alcohol etílico. Los gramos de células obtenidos por gramo de carbón en el substrato aumentan, con 7,95 CV
5 por 1000 litros, desde 0,33 hasta 1,34. Se obtienen ventajas significativas adicionales con respecto a la concentración de oxígeno en el aire, al total de grasas resultantes y a los aminoácidos obtenidos. Estas ventajas son muy importantes con una energía relativamente baja, tal como por
10 ejemplo cuando la energía está dentro del margen de aproximadamente 2,65 a 21,20, particularmente 7,95 a 10,60, CV/1000 litros.

Estos datos muestran la misma ventaja en cuanto a calidad de producto previamente ilustrada para substratos oxigenados, es decir menores contenidos de grasas
15 y mayores concentraciones de aminoácidos y de nitrógeno total. Además, ilustran las mejoras de eficacia de fermentación con substratos oxigenados. Considerando los datos más deseables de baja energía de mezclado (7,95 CV/1000 litros),
20 se requieren concentraciones de oxígeno más bajas, para la misma velocidad de crecimiento, cuando se utiliza etanol que cuando se utiliza n-parafina. Las ventajas de substratos oxigenados con bajo consumo de energía están ilustradas específicamente en el siguiente ejemplo.

25 Ejemplo 4

Se condujeron operaciones adicionales de fermentación aerobia continua utilizando un medio P₁ y etanol a
30 35°C con *Micrococcus cerificans*. El porcentaje de aumento de utilización de oxígeno comparado con un substrato de n-parafina está mostrado en el cuadro I.

1.7.68.



A causa de la solubilidad de etanol en el medio de fermentación, hay presente una fase menos en el fermentador con etanol en calidad de substrato que con n-parafinas. Consiguientemente, cuando el etanol es el único manantial de carbono, se reduce la resistencia a la transferencia de masas y aumenta la utilización de oxígeno con consumo de energía constante. En efecto, un aumento de utilización de oxígeno de 210% se realiza con un consumo de energía de 7,95 CV/1000 litros por la utilización de etanol en lugar de n-parafinas (tal como se muestra en el cuadro 1). Estos resultados indican que para lograr una velocidad de crecimiento equivalente con el mismo bajo consumo de energía con n-parafinas, la fuerza de impulsión para la transferencia de masa con oxígeno habrá de ser mejorada enriqueciendo grandemente con oxígeno la corriente de gas entrante. A partir de estos datos, aproximadamente 3 veces la cantidad de oxígeno habrá de ser alimentada continuamente al fermentador para producir un rendimiento de células igual cuando se utilizan n-parafinas. Alternativamente, se podrían lograr velocidades de crecimiento equivalentes, sin enriquecer la corriente gaseosa de entrada, aumentando grandemente el consumo de energía. Así, para un rendimiento de células constante y una concentración de oxígeno de entrada constante, la utilización de etanol, en virtud de su solubilidad en el medio de fermentación, aumenta grandemente la transferencia de masas y permite que la fermentación se conduzca con cantidades de energía considerablemente reducidas. Como este beneficio se deriva de la solubilidad del etanol, es evidente que la utilización de otros substratos solubles mostraría la misma ventaja.

30
1.7.68.

Ejemplo 5

Se oxidó eicosano (C_{20}) utilizando una solución de permanganato de potasio que contenía una pequeña cantidad de hidróxido de sodio. Se insufló aire a través de la solución que contenía el eicosano durante aproximadamente 4 horas. La temperatura de la solución era de $120^{\circ}C$. La mezcla de reacción fue neutralizada con hidróxido de sodio y fue puesta en contacto con agua. Se formó una fase acuosa que contenía los ácidos, la cual fase fue separada. Se añadió hexano a la fase residual, que nuevamente fue extraída con agua. El hexano fue eliminado y se segregó una fase hidrocarbonada oxigenada $C_{12}-C_{18}$. Se hizo crecer *Micrococcus cerificans* (14.987) a $30^{\circ}C$ con una velocidad de agitación de 300 rpm. utilizando 1% de los compuestos oxigenados $C_{12}-C_{18}$ sobre una base de carbono en un medio P_1 . El peso de células obtenidas fue de 3,46 g/litro. Este es el máximo rendimiento de células que se puede obtener basado en la cantidad estimada de carbono presente. Los aminoácidos esenciales producidos por este sustrato están mostrados en la siguiente tabla, comparado con los obtenidos con un sustrato de fracción hidrocarbonada C_{16} .

1.7.68.



TABLA VI

Micrococcus cerificans

Aminoácidos esenciales	C ₁₆	Compuestos oxigena dos C ₁₂ -C ₁₈	% de aumen to
5 Isoleucina	3,2	3,7	15
Leucina	5,0	5,5	10
Lisina	4,6	4,7	2
Fenilalanina	2,5	2,8	12
Tirosina	2,3	2,4	4
10 Cistina	0,5	0,7	40
Metionina	1,4	1,6	14
Treonina	3,7	4,1	11
Valina	3,7	4,4	19

15 Se ha de hacer observar que el contenido de aminoácidos sulfurados (cistina y metionina) aumentó en 21% con relación al producido cuando se utilizan fracciones C₁₆, y que hubo un aumento general de los aminoácidos esenciales.

20 Ejemplo 6

Se hizo crecer *Micrococcus cerificans* (14.987) a 30°C a 300 rpm, utilizando 1% de una mezcla de compuestos oxigenados (mezcla A), descrita anteriormente, en un medio P₁. Se obtuvo un peso de células de 2,66 g por litro.

25 Este es el máximo rendimiento de células que se puede obtener basado en la suposición de que el 50% de las células microbianas es carbono y una mitad del carbono se transforma en dióxido de carbono. El *Micrococcus cerificans* que ha crecido en la mezcla de compuestos oxigenados, comparado con una fracción hidrocarbonada C₁₆, muestra un importante

30
1.7.68.

aumento del contenido de aminoácidos sulfurados, a saber de 14%, y de contenido de proteínas de 16%. Esto está mos trado en la siguiente tabla.

TABLA VII

Substrato	Gramos de aminoácido por 100 g de proteínas		Total de pro teínas (x) (Nx6,25)
	Amino ácidos sulfurados	Lisina	
C ₁₆	1,86	4,57	61,7
Mezcla A (compues- tos oxigenados)	2,12	5,01	72,2

(x) Determinación por Kjeldahl

Tal como se observará a partir de los ejemplos 5 y 6, el *Micrococcus cerificans* tiene la aptitud de utili zar una mezcla de compuestos oxigenados. También, cuando el microorganismo es cosechado de acuerdo con este invento, posee un alto contenido de proteínas, un alto perfil de aminoácidos esenciales y una composición de aminoácidos nu tritivamente atractiva.

Ejemplo 7.

Se llevaron a cabo un cierto número de proce- dimientos de fermentación aerobia utilizando medio P₁ a una temperatura de aproximadamente 30°C, y tal como se des cribe utilizando diversos hidrocarburos oxigenados. El mi- croorganismo utilizado fue *Micrococcus cerificans* (14.987).

El contenido de proteínas, el índice de amino- ácidos esenciales y la composición de aminoácidos del mi- croorganismo hecho crecer sobre diversos hidrocarburos oxi genados puros, fueron determinados utilizando los procedi- mientos y cálculos analíticos acostumbrados.

El contenido de proteínas (expresado como un

30
1.7.68.

31 JUN 1968

porcentaje) es calculado a partir del porcentaje en peso de nitrógeno determinado de las células (determinado por el método de Kjeldahl), multiplicando por un factor de 6,25.

5 El índice de aminoácidos esenciales de las células cosechadas es determinado utilizando el método convencional empleando huevo como base de comparación. Se considera que el huevo es una proteína perfecta que tiene un índice de aminoácidos esenciales (A.A.E.) de 100,0.

10 Para determinar los perfiles de aminoácidos de las células cosechadas, se utilizaron análisis cromatográficos para determinar todos los componentes enumerados con la excepción de triptófano, que fue determinado por análisis microbiológico.

15 El contenido de proteínas, los índices de aminoácidos esenciales, y las composiciones de aminoácidos de las células cosechadas, están indicados en la siguiente tabla.

1.7.68.

TABLA VIII

MICROCOCCUS CERIFICANS HECHO CRECER SOBRE DIVERSOS COMPUESTOS OXIGENADOS

Aminoácido	Gramos de aminoácido por 100 g de proteína							
	6,5	6,7	6,1	7,4	5,5	6,2	5,9	5,2
Alanina	4,2	4,2	4,8	5,1	3,3	4,1	4,9	4,1
Arginina	7,9	7,6	6,3	7,0	6,2	6,1	6,4	5,3
Acido aspártico	0,1	0,2	0,2	P	0,2	0,1	0,1	0,2
Acido cisteico	0,3	0,4	0,4	0,3	0,0	0,3	0,5	0
Acido Glutámico	8,8	8,4	9,4	10,8	6,5	8,9	8,2	5,9
Glicina	3,5	3,5	3,3	3,6	3,2	3,4	3,3	2,9
Histidina	2,3	3,1	2,3	2,4	3,3	2,1	1,6	2,7
Isoleucina	4,6	3,7	2,7	3,4	3,3	2,1	3,0	2,5
Ileucina	6,1	5,2	5,3	5,6	4,3	4,6	5,4	3,7
Lisina	4,9	5,4	4,1	3,9	4,8	3,8	4,3	4,6
Metionina	1,4	1,4	1,6	1,4	0	1,3	1,6	0,8
Sulfóxido de metionina	0,4	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3
Penilalanina	3,2	2,9	2,6	2,6	2,6	2,4	2,5	2,3
Prolina	3,4	2,6	3,2	3,3	2,7	2,5	2,4	2,8
Serina	3,1	3,1	2,8	2,7	2,6	2,3	2,6	2,6
Treonina	3,7	3,5	2,9	3,9	3,1	3,5	2,8	3,2
Tirosina	2,7	2,4	2,1	2,0	1,8	2,0	2,1	1,8
Valina	6,6	3,4	3,5	4,3	3,7	3,1	4,0	3,0
Triptófano	N,E	1,12	0,67	0,72	0,67	0,78	N,E	N,E
Total de proteínas (N x 6,25)	78,75	44,63	74,13	69,75	55,00	64,50	67,60	55,63
Índice de A.A.E.	68,4	57,9	51,3	55,2	50,3	47,0	53,5	45,1
<u>Condiciones de fermentación</u>								
l/3 de sustrato sobre base de carbón	Alcohol etílico	Acido oleico	Alcohol cetílico	Alcohol metílico	alcohol sec-butílico	alcohol isopropílico	Alcohol butílico normal	Metil etil cetona
Peso de Células g/litro en 24 horas	3,69	5,76	5,58	4,62	4,40	1,41	1,01	1,25
Peso de células g/litro en 43 horas	6,96							

N.E. = No ensayado.

- 39 -

TABLA VIII
MICROCOCGUS CERIFICANS HECHO CRECER S

<u>Aminoácido</u>	<u>Gramos de aminoáci</u>		
Alanina	6,5	6,7	6,1
Arginina	4,2	4,2	4,8
Acido aspártico	7,9	7,6	6,3
Acido cisteico	0,1	0,2	0,2
Cistina	0,3	0,4	0,4
Acido glutámico	8,8	8,4	9,4
Glicina	3,5	3,5	3,3
Histidina	2,3	3,1	2,3
Isoleucina	4,6	3,7	2,7
Leucina	6,1	5,2	5,3
Lisina	4,9	5,4	4,1
Metionina	1,4	1,4	1,6
Sulfóxido de metionina	0,4	0,1	0,2
Fenilalanina	3,2	2,9	2,6
Prolina	3,4	2,6	3,2
Serina	3,1	3,1	2,8
Treonina	3,7	3,5	2,9
Tirosina	2,7	2,4	2,1
Valina	6,6	3,4	3,5
Triptófano	N,E	1,12	0,67
Total de proteínas (N x 6,25)	78,75	44,63	74,13
Índice de A.A.E.	68,4	57,9	51,3
<u>Condiciones de fermentación</u>			
l% de substrato sobre base de carbón	Alcohol etílico	Acido oleico	Alcohol cetílico
Peso de Células g/litro en 24 horas	3,69	5,76	5,58
Peso de células g/litro en 48 horas	6,96		

N.E. = No ensayado.

1.7.68.



I

TRABAJOS SOBRE DIVERSOS COMPUESTOS OXIGENADOS

ácido por 100 g de proteína

7,4	5,5	6,2	5,9	5,2
5,1	3,3	4,1	4,9	4,1
7,0	6,2	6,1	6,4	5,3
P	0,2	0,1	0,1	0,2
0,3	0,0	0,3	0,5	0
10,8	6,5	8,9	8,2	5,9
3,6	3,2	3,4	3,3	2,9
2,4	3,3	2,1	1,6	2,7
3,4	3,3	2,1	3,0	2,5
5,6	4,3	4,6	5,4	3,7
3,9	4,8	3,8	4,3	4,6
1,4	0	1,3	1,6	0,8
0,2	0,3	0,1	0,3	0,3
2,6	2,6	2,4	2,5	2,3
3,3	2,7	2,5	2,4	2,8
2,7	2,6	2,3	2,6	2,6
3,9	3,1	3,5	2,8	3,2
2,0	1,8	2,0	2,1	1,8
4,3	3,7	3,1	4,0	3,0
0,72	0,67	0,78	N,E	N,E
69,75	55,00	64,50	67,60	55,63
55,2	50,3	47,0	53,5	45,1

Alcohol metílico

alcohol sec-butílico

alcohol isopropílico

Alcohol butílico normal

Metil etil cetona

4,62

4,40

1,41

1,01

1,25



Tal como se observará a partir de los datos precedentes, el *Micrococcus cerificans*, cuando es cosechado de acuerdo con este invento, posee la valiosa combinación de un alto contenido de proteínas superior al 50%, un alto índice de aminoácidos esenciales por encima de 45%, y un perfil de aminoácidos nutritivamente atractivo, indicando así además la utilización del presente invento para cosechar proteínas utilizables por biosíntesis de una manera extremadamente rentable. Así, el presente invento es especialmente útil para preparar suplementos para alimentos para seres humanos o para piensos para animales, que tienen importante contenido de proteínas y valor nutritivo global.

Ejemplo 8.

Se condujeron fermentaciones aerobias adicionales utilizando medio P₁ y nueve diversas bacterias. La temperatura fue de 30°C y el pH inicial de 7,8. El substrato fue alcohol etílico. El contenido de nitrógeno, el contenido de proteínas (porcentaje de proteínas), el índice de A.A.E. (aminoácidos esenciales) y el perfil de aminoácidos fueron determinados como en el Ejemplo 7. Los resultados están tabulados en la siguiente tabla.

1.7.68.



TABLE IX

DIVERSOS MICROORGANISMOS HECHOS CRECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

Aminoácidos	Gramos de aminoácido por 100 Gramos de proteínas										
Alanina	5,9	5,8	6,1	6,2	5,9	6,5	6,2	5,9	6,5	6,2	7,4
Arginina	5,0	4,8	5,2	5,3	4,9	5,2	4,7	4,9	5,2	4,7	5,1
Acido aspártico	6,5	6,2	6,6	7,0	6,4	6,7	6,5	6,4	6,7	6,5	7,0
Acido cisteico	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Cistina	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3
Acido glutámico	7,6	9,3	8,8	8,0	8,2	8,6	8,6	8,2	8,6	8,6	10,8
Glicina	3,5	3,5	3,7	3,7	3,3	3,8	3,4	3,3	3,8	3,4	3,8
Histidina	2,8	3,3	3,2	3,1	1,6	3,1	2,5	1,6	3,1	2,5	2,4
Isoleucina	3,1	2,7	3,1	3,1	3,0	3,1	3,1	3,0	3,1	3,1	3,4
Leucina	5,5	5,3	5,9	5,8	5,4	5,7	5,4	5,4	5,7	5,4	5,6
Lisina	4,5	4,4	4,7	4,6	4,3	4,8	4,3	4,3	4,8	4,3	3,9
Metionina	1,6	1,8	1,6	1,4	1,6	1,7	1,6	1,6	1,7	1,6	1,4
Sulfóxido de metionina	0,3	0,3	0,4	0,6	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2
Fenilalanina	2,6	2,4	2,8	2,6	2,5	2,7	2,7	2,5	2,7	2,7	2,6
Prolina	2,4	2,5	2,6	2,4	2,4	2,5	2,8	2,4	2,5	2,8	3,3
Serina	2,8	2,7	2,8	2,8	2,6	3,0	2,2	2,6	3,0	2,2	2,7
Treonina	2,9	3,0	3,1	3,2	2,8	3,1	3,9	2,8	3,1	3,9	3,9
Girosina	2,2	2,1	2,4	2,2	2,1	2,3	2,1	2,1	2,3	2,1	2,0
Valina	3,7	3,7	4,1	3,9	3,7	4,1	4,0	3,7	4,1	4,0	4,3
Total de proteínas (Nx6,25)	67,63	68,63	68,69	68,31	67,56	68,75	67,69	67,56	68,75	67,69	69,8
Indice de A.A.E.	54,1	52,7	57,5	56,3	52,9	57,1	56,3	52,9	57,1	56,3	55,2
Microorganismo ATCC #	15528	15522	15523	15524	15525	15526	15527	15525	15526	15527	QMB1518 ^m
<u>Condiciones de fermentación</u>											
Cm3 de EtOH					1,6			1,6			19140
Peso de células, g/litro en 24 horas	4,04	3,6	3,94	4,38	3,98	3,32	3,70	3,98	3,32	3,70	1,5
Peso de células, g/litro en 48 horas	6,7	7,1	8,0	8,5	7,87	6,0	6,85	7,87	6,0	6,85	3,2

(n) Quartermaster Culture Collection, Natick, Mass.

- 44 -

TABLA IX

DIVERSOS MICROORGANISMOS HECHOS

<u>Aminoácidos</u>	<u>Gramos de aminoác</u>			
Alanina	5,9	5,8	6,1	6,2
Arginina	5,0	4,8	5,2	5,3
Acido aspártico	6,5	6,2	6,6	7,0
Acido cisteico	0,2	0,1	0,1	0,1
Cistina	0,3	0,4	0,4	0,5
Acido glutámico	7,6	9,3	8,8	8,0
Glicina	3,5	3,5	3,7	3,7
Histidina	2,8	3,3	3,2	3,1
Isoleucina	3,1	2,7	3,1	3,1
Leucina	5,5	5,3	5,9	5,8
Lisina	4,5	4,4	4,7	4,6
Metionina	1,6	1,8	1,6	1,4
Sulfóxido de metionina	0,3	0,3	0,4	0,6
Fenilalanina	2,6	2,4	2,8	2,6
Prolina	2,4	2,5	2,6	2,4
Serina	2,8	2,7	2,8	2,8
Treonina	2,9	3,0	3,1	3,2
Tirosina	2,2	2,1	2,4	2,2
Valina	3,7	3,7	4,1	3,9
Total de proteínas (Nx6,25)	67,63	68,63	68,69	68,31
Índice de A.A.E.	54,1	52,7	57,5	56,3
Microorganismo ATCC #	15528	15522	15523	15524
<u>Condiciones de fermentación</u>				
Cm ³ de EtOH				
Peso de células, g/litro en 24 horas	4,04	3,6	3,94	4,38
Peso de células, g/litro en 48 horas	6,7	7,1	8,0	8,5

(m) Quartermaster Culture Collection, Natick, Mass.

1..7..68.



TABLA IX

HECHOS CRECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

aminoácido por 100 gramos de proteínas

6,2	5,9	6,5	6,2	9,0	7,4
5,3	4,9	5,2	4,7	4,0	5,1
7,0	6,4	6,7	6,5	5,5	7,0
0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,3
8,0	8,2	8,6	8,6	16,9	10,8
3,7	3,3	3,8	3,4	3,7	3,8
3,1	1,6	3,1	2,5	3,0	2,4
3,1	3,0	3,1	3,1	1,8	3,4
5,8	5,4	5,7	5,4	3,4	5,6
4,6	4,3	4,8	4,3	6,9	3,9
1,4	1,6	1,7	1,6	0,9	1,4
0,6	0,3	0,3	0,4	0,1	0,2
2,6	2,5	2,7	2,7	1,5	2,6
2,4	2,4	2,5	2,8	2,5	3,3
2,8	2,6	3,0	2,2	2,1	2,7
3,2	2,8	3,1	3,9	2,6	3,9
2,2	2,1	2,3	2,1	1,2	2,0
3,9	3,7	4,1	4,0	3,2	4,3
68,31	67,56	68,75	67,69	65,9	69,8
56,3	52,9	57,1	56,3	44,1	55,2
15524	15525	15526	15527	QMB1518 ^{III}	19140

-----	1,6	-----	-----	-----	-----
4,38	3,98	3,32	3,70	1,08	1,5
8,5	7,87	6,0	6,85	2,22	3,2

A partir de lo que antecede, es evidente que diversas bacterias crecerán con facilidad sobre un hidrocarburo oxigenado puro. Cada uno de los nueve microorganismos tenía un alto contenido de proteínas superior a 65%, un alto índice de aminoácidos esenciales superior a 45%, y un perfil de aminoácidos nutritivamente atractivo.

Ejemplo 9

Se condujeron un cierto número de fermentaciones aerobias utilizando medios I, II y III y etanol a 30°C, con las siguientes levaduras. El pH fue mantenido entre 3 y 6,5, preferiblemente entre 4 y 5.

- A. *Saccharomyces cerevisiae* - CBS
- B. *Saccharomyces acidifaciens* - ATCC 8766
- C. *Trigonopsis variabilis* - ATCC 10679
- D. *Hansenula anomala* - CBS
- E. *Candida lipolytica* - ATCC 8662
- F. *Candida pulcherrima* - ATCC 9889
- G. *Rhodotorula glutinis* - ATCC 2527
- H. *Candida guilliermondii* - ATCC 9390

El contenido de nitrógeno, el contenido de proteínas (porcentaje de proteínas), el índice de A.A.E., y los perfiles de aminoácidos fueron determinados como en el Ejemplo 7.

Los resultados están enumerados en las siguientes tablas.



31

TABLA X
DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CRECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

Aminoácidos	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteínas										
	6,6	5,4	7,7	6,7	8,2	5,2	5,8	9,4	6,8	5,5	5,3
Alanina	5,7	5,2	5,0	4,1	5,0	5,1	10,2	3,5	5,1	3,8	3,8
Arginina	7,1	7,1	8,6	7,8	9,9	8,0	6,6	8,2	7,3	7,4	6,5
Acido aspártico	0,3	0,2	0,2	0,2	0,9	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4
Acido cisteico	0,8	0,8	1,2	0,7	0	0,6	0,5	0,4	0,7	0,7	0,4
Cistina	11,5	10,5	13,3	12,3	11,6	8,7	8,8	11,2	10,5	8,4	8,0
Acido glutámico	3,1	3,0	3,9	3,6	4,3	3,2	3,1	8,7	3,3	3,4	3,0
Glicina	2,9	2,7	3,2	3,2	3,2	3,2	2,9	2,0	2,7	2,8	2,5
Histidina	3,1	2,9	3,2	3,2	4,8	3,3	3,1	4,7	3,1	3,4	3,4
Isoleucina	5,1	5,0	6,0	5,5	6,7	5,7	5,0	3,9	5,1	5,7	5,4
Leucina	5,9	5,7	6,6	6,6	6,9	7,2	6,0	7,4	5,7	6,0	5,4
Lisina	1,0	1,1	1,5	1,4	1,2	1,2	1,0	1,0	0,8	1,1	1,1
Metionina	0,3	0,2	0	0,5	0,5	0,5	0,6	0,3	0,3	0,2	0,3
Sulfóxido de metionina	2,9	3,2	3,2	3,1	3,8	3,3	2,8	2,3	3,0	3,1	3,0
Fenilalanina	2,9	2,8	3,5	2,9	3,5	2,9	3,7	3,3	2,7	2,9	2,6
Prolina	4,1	3,9	4,6	4,4	4,9	4,4	3,9	4,2	4,5	4,1	3,3
Serina	4,3	3,8	4,5	4,3	5,1	4,5	6,0	4,4	4,3	4,1	3,5
Treonina	2,7	2,9	2,9	2,8	3,0	2,7	2,4	1,3	2,6	2,8	2,6
Tirosina	3,8	3,5	6,0	5,0	5,3	4,2	3,6	5,7	3,9	4,3	3,8
Valina	33,3	39,1	36,4	40,7	42,9	43,4	38,4	36,9	32,5	44,8	59,3
Total de proteínas (Nx6,25)	60,8	59,0	70,8	67,0	76,9	67,4	63,0	63,6	60,2	63,8	59,0

Levadura	A			B		
	I	II	III	I	II	III
Medio	I	II	III	I	II	III
cm3 de EtOH	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Peso de células c/l	6,3	6,8	6,9	2,1	6,2	8,3
Tiempo de fermentación (horas)	72	72	96	96	72	72

43 - 100

TABLA X

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CRECER

<u>Aminoácidos</u>	<u>Gramos de aminoácido</u>			
Alanina	6,6	5,4	7,7	6,7
Arginina	5,7	5,2	5,0	4,1
Acido aspártico	7,1	7,1	8,6	7,8
Acido cisteico	0,3	0,2	0,2	0,2
Cistina	0,8	0,8	1,2	0,7
Acido glutámico	11,5	10,5	13,3	12,3
Glicina	3,1	3,0	3,9	3,6
Histidina	2,9	2,7	3,2	3,2
Isoleucina	3,1	2,9	3,2	3,2
Leucina	5,1	5,0	6,0	5,5
Lisina	5,9	5,7	6,6	6,6
Metionina	1,0	1,1	1,5	1,4
Sulfóxido de metionina	0,3	0,2	0	0,5
Fenilalanina	2,9	3,2	3,2	3,1
Prolina	2,9	2,8	3,5	2,9
Serina	4,1	3,9	4,6	4,4
Treonina	4,3	3,8	4,5	4,3
Tirosina	2,7	2,9	2,9	2,8
Valina	3,8	3,5	6,0	5,0
Total de proteínas (Nx6,25)	33,3	39,1	36,4	40,7
Indice de A.A.E.	60,8	59,0	70,8	67,0

Condiciones de fermentación

Levadura	<u>A</u>			
	----- Saccharomyces cerevisiae			
Medio	I	I	II	II
cm ³ de EtOH	-----			1,6 -----
Peso de células g/l	6,3	4,9	6,8	7,2
Tiempo de fermentación (horas)	72	72	72	72

1.7.68.

31. 11. 1938

BIA X

RECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

noácido por 100 gramos de proteínas

6,7	8,2	5,2	5,8	9,4	6,8	5,5	5,3
4,1	5,0	5,1	10,2	3,5	5,1	3,8	3,8
7,8	9,9	8,0	6,6	8,2	7,3	7,4	6,5
0,2	0,9	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4
0,7	0	0,6	0,5	0,4	0,7	0,7	0,4
12,3	11,6	8,7	8,8	11,2	10,5	8,4	8,0
3,6	4,3	3,2	3,1	8,7	3,3	3,4	3,0
3,2	3,2	3,2	2,9	2,0	2,7	2,8	2,5
3,2	4,8	3,3	3,1	4,7	3,1	3,4	3,4
5,5	6,7	5,7	5,0	3,9	5,1	5,7	5,4
6,6	6,9	7,2	6,0	7,4	5,7	6,0	5,4
1,4	1,2	1,2	1,0	1,0	0,8	1,1	1,1
0,5	0,5	0,5	0,6	0,3	0,3	0,2	0,3
3,1	3,8	3,3	2,8	2,3	3,0	3,1	3,0
2,9	3,5	2,9	3,7	3,3	2,7	2,9	2,6
4,4	4,9	4,4	3,9	4,2	4,5	4,1	3,3
4,3	5,1	4,5	6,0	4,4	4,3	4,1	3,5
2,8	3,0	2,7	2,4	1,3	2,6	2,8	2,6
5,0	5,3	4,2	3,6	5,7	3,9	4,3	3,8
40,7	42,9	43,4	38,4	36,9	32,5	44,8	59,3
67,0	76,9	67,4	63,0	63,6	60,2	63,8	59,0

B

<u>isiae</u>		<u>Saccharomyces</u>					
		<u>Zygosaccharomyces acidifaciens</u>					
II	III	I	I	II	II	III	III
----- 1,6 -----							
7,2	6,9	2,1	4,5	6,2	7,7	8,3	6,0
72	96	96	96	72	72	72	72

43 - 1938

TABLA XI

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CRECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

Aminoácidos	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteínas									
	5,3	7,1	6,2	4,6	5,0	5,3	4,9	6,5	5,6	5,7
Alanina	5,9	7,1	6,2	4,6	5,0	5,3	4,9	6,5	5,6	5,7
Arginina	5,1	4,0	4,5	4,2	4,3	4,6	5,1	4,6	4,4	5,0
Ácido aspártico	7,6	6,5	6,3	6,8	7,0	7,6	8,6	7,9	7,2	8,3
Ácido cisteico	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1
Cistina	0,6	0,6	0,7	0,4	0,6	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8
Ácido glutámico	9,2	9,9	9,8	7,1	7,0	8,4	10,9	11,8	11,1	12,9
Glicina	3,4	3,2	2,9	2,9	3,3	3,1	3,2	3,2	3,1	3,6
Histidina	3,7	2,7	2,3	2,7	2,3	2,4	3,0	2,8	2,7	2,9
Isoleucina	4,0	3,6	2,7	3,3	3,7	3,3	3,3	3,5	3,5	3,7
Leucina	5,6	5,9	4,6	5,5	5,8	5,4	5,9	5,2	5,1	5,6
Lisina	6,0	6,2	4,7	5,1	4,7	5,1	6,7	6,2	5,8	6,2
Metionina	3,3	1,3	0,9	1,1	1,3	1,9	1,3	1,2	1,1	1,1
Sulfóxido de metionina	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Fenilalanina	2,9	3,2	2,5	3,5	3,2	3,0	3,3	3,0	2,9	3,3
Prolina	2,7	3,0	3,2	2,9	2,9	3,1	3,4	4,3	3,0	3,3
Serina	3,3	3,5	3,5	3,6	3,5	3,5	4,1	4,0	4,0	4,0
Treonina	4,0	3,9	3,6	3,7	4,0	3,7	4,2	4,5	4,2	4,3
Tirosina	2,6	2,8	2,2	2,7	2,7	2,6	2,9	2,7	2,6	3,0
Valina	4,2	4,0	3,4	3,8	4,1	3,6	4,0	4,0	3,6	4,0
Total de proteínas (Mx6,25)	56,1	62,7	41,1	47,3	57,0	62,9	45,9	33,8	35,5	33,5
Índice de A.A.E.	67,8	64,0	60,0	59,2	61,4	60,2	65,6	63,6	60,2	65,2
Condiciones de fermentación										
Levadura Medio cm ³ de EHOH	<u>C</u>									
	Trigonopsis variabilis									
Peso de células /1	I	II	II	III	III	I	I	II	III	III
	4,0	5,2	7,4	7,6	7,1	7,2	7,2	8,0	7,7	8,0
Tiempo de fermentación (horas)	-----72-----									
	-----72-----									
Condiciones de fermentación	<u>D</u>									
	Hansenula anomala									
Levadura Medio cm ³ de EHOH	-----72-----									
	-----72-----									

-44- 1/2

TABLA 2

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS C

<u>Aminoácidos</u>	<u>Gramos de amir</u>				
Alanina	5,9	5,3	7,1	6,2	4
Arginina	5,1	4,8	4,0	4,5	4
Acido aspártico	7,8	7,3	6,5	6,3	6
Acido cisteico	0,1	0,1	0,2	0,2	0
Cistina	0,6	0,5	0,6	0,7	0
Acido glutámico	9,2	7,6	9,9	9,8	7
Glicina	3,4	3,2	3,2	2,9	2
Histidina	3,7	3,4	2,7	2,3	2
Isoleucina	4,0	3,6	3,3	2,7	3
Leucina	5,6	5,9	5,4	4,6	5
Lisina	6,0	6,2	5,3	4,7	5
Metionina	3,3	1,3	1,0	0,9	1
Sulfóxido de metionina	0,4	0,3	0,5	0,4	0
Fenilalanina	2,9	3,2	3,1	2,5	3
Prolina	2,7	3,0	2,7	3,2	2
Serina	3,3	3,5	3,6	3,5	3
Treonina	4,0	3,9	3,7	3,6	3
Tirosina	2,6	2,8	2,8	2,2	2
Valina	4,2	4,0	3,9	3,4	3
Total de proteínas (Nx6,25)	58,1	62,7	41,1	40,9	47
Indice de A.A.E.	67,8	64,0	60,0	52,1	59

Condiciones de fermentación

	<u>C</u>				
Levadura	----- <i>Trigonopsis variabilis</i> -----				
Medio	I	I	II	II	I
cm ³ de EtOH	-----	-----	1,6	-----	-----
Peso de células g/l	4,0	5,2	7,4	7,6	7
Tiempo de fermentación (horas)	-----72-----				

1.7.68.

31 JUL 1959



TABLA XI

FECHAS CRECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

de aminoácido por 100 gramos de proteínas

4,6	5,0	5,3	4,9	6,5	5,6	5,6	5,7
4,2	4,3	4,6	5,1	4,6	4,4	5,0	5,0
6,8	7,0	7,6	8,6	7,9	7,2	8,3	8,8
0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
0,4	0,6	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,8
7,1	7,0	8,4	10,9	11,8	11,1	12,1	12,9
2,9	3,3	3,1	3,2	3,2	3,1	3,4	3,6
2,7	2,3	2,4	3,0	2,8	2,7	3,1	2,9
3,3	3,7	3,3	3,3	3,5	3,5	3,7	3,7
5,5	5,8	5,4	5,9	5,2	5,1	5,8	5,6
5,1	4,7	5,1	6,7	6,2	5,8	6,3	6,2
1,1	1,3	1,9	1,3	1,2	1,1	1,0	1,1
0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,6	0,3
3,5	3,2	3,0	3,3	3,0	2,9	3,3	3,3
2,9	2,9	3,1	3,4	4,3	3,0	3,6	3,3
3,6	3,5	3,5	4,1	4,0	4,0	4,3	4,0
3,7	4,0	3,7	4,2	4,5	4,2	4,7	4,3
2,7	2,7	2,6	2,9	2,7	2,6	3,0	3,0
3,8	4,1	3,6	4,0	4,0	3,6	4,2	4,0
47,3	57,0	62,9	45,9	33,8	35,5	32,3	33,5
59,2	61,4	60,2	65,6	63,6	60,2	67,6	65,2

D

lis		Hansenula anomala					
III	III	I	I	II 1,6	II	III	III
7,1	5,7	7,2	7,2	8,0	7,7	8,0	7,8
		72	72	72	72	96	96

-44- Ms

TABLA XII

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CRECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

Aminoácido	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteínas									
	5,0	4,9	6,4	5,8	5,0	4,6	5,1	5,06	4,9	6,2
Alanina	4,0	12,1	4,7	5,7	4,7	4,6	5,0	4,4	6,2	7,3
Arginina	7,0	7,5	6,7	7,3	6,9	5,9	7,6	7,2	7,3	0,3
Acido aspártico	0	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3	0,5
Acido cisteico	0	0,7	0,6	0,6	0,5	0	0,5	0,3	0,5	0,5
Gistina	6,7	7,9	9,5	9,0	7,2	7,1	7,6	7,4	6,9	2,9
Acido glutámico	2,6	3,2	3,2	3,1	3,0	2,8	2,7	3,02	2,9	4,0
Glicina	3,1	3,1	3,1	2,6	3,5	4,2	3,3	4,0	4,0	2,8
Histidina	2,7	3,4	3,4	3,1	3,0	2,6	3,1	3,5	5,2	7,0
Isoleucina	5,7	5,3	5,3	4,7	5,1	2,6	5,1	6,9	6,8	1,0
Leucina	6,2	6,4	5,6	5,5	6,1	6,1	6,2	6,8	0,9	0,7
Lisina	1,1	0,9	1,2	0,9	0,8	0,7	1,1	1,0	0,7	2,6
Metionina	0	0,5	0,6	0,8	0,5	0,4	0,7	0,6	2,0	2,6
Sulfóxido de metionina	3,3	3,0	3,2	2,7	2,8	2,5	3,9	3,4	4,3	5,0
Fenilalanina	3,1	3,0	3,9	2,6	2,9	2,4	2,6	2,6	2,1	3,9
Prolina	4,4	4,0	3,7	4,8	1,8	4,1	4,5	5,3	2,0	4,3
Serina	4,2	4,0	3,8	5,6	4,5	3,9	4,4	5,2	4,3	5,0
Treonina	2,9	2,9	2,7	2,3	2,5	2,1	2,3	2,4	2,1	3,9
Tirosina	4,1	4,0	4,0	3,7	3,8	3,5	4,3	4,5	3,9	32,0
Valina	33,5	32,3	42,9	36,3	37,7	36,7	39,7	32,0	39,2	62,6
Total de proteínas (Mr6,25)	60,8	63,2	61,8	61,2	60,4	50,0	62,4	70,0		
Indice de A.A.E.										
Condiciones de fermentación										

Levadura	E			F		
	Candida lipolytica			Candida pulcherrima		
Medio	I	II	III	II	III	III
cm3 de EtOH						
Peso de células #/l	7,0	4,1	6,9	6,6	7,2	6,8
Tiempo de fermentación (horas)	72	72	72	72	48	43
			1,6			1,6
				5,9	5,1	5,6
				96	72	72

-115-0301

TABLA XII

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CI

<u>Aminoácido</u>	<u>Gramos de amino</u>		
Alanina	5,0	4,9	6,4
Arginina	4,0	12,1	4,7
Acido aspártico	7,0	7,5	6,7
Acido cisteico	0	0,3	0,3
Cistina	0	0,7	0,6
Acido glutámico	6,7	7,9	9,5
Glicina	2,6	3,2	3,2
Histidina	3,1	3,1	3,1
Isoleucina	2,7	3,4	3,4
Leucina	5,7	5,3	5,3
Lisina	6,2	6,4	5,6
Metionina	1,1	0,9	1,2
Sulfóxido de metionina	0	0,5	0,6
Fenilalanina	3,3	3,0	3,2
Prolina	3,1	3,0	3,9
Serina	4,4	4,0	3,7
Treonina	4,2	4,0	3,8
Tirosina	2,9	2,9	2,7
Valina	4,1	4,0	4,0
Total de proteínas (Nx6,25)	33,5	32,3	42,9
Indice de A.A.E.	60,8	63,2	61,8

Condiciones de fermentación

Levadura	<u>E</u>		
	-----Candida lipolytica-----		
Medio	I	I	II
cm ³ de EtOH	-----1,6-----		
Peso de células g/l	7,0	4,1	6,9
Tiempo de fermentación (horas)	72	72	72

1.7.68.

31 JUL 1968

A XII

CHAS GREGER SOBRE ALCOHOL ETILICO

e aminoácido por 100 gramos de proteínas

5,8	5,0	4,6	5,1	5,06	4,9
5,7	4,7	4,6	5,0	4,4	6,2
7,3	6,9	5,9	7,6	7,2	7,3
0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3
0,6	0,5	0	0,5	0,3	0,6
9,0	7,2	7,1	7,6	7,4	6,9
3,1	3,0	2,8	2,7	3,02	2,9
2,6	3,5	4,2	3,3	4,0	4,0
3,1	3,0	2,6	3,1	3,5	2,8
4,7	5,1	2,6	5,1	6,9	5,2
5,5	6,1	6,1	6,2	6,8	7,0
0,9	0,8	0,7	1,1	1,0	0,9
0,8	0,5	0,4	0,7	0,6	0,7
2,7	2,8	2,5	3,0	3,4	2,6
2,6	2,9	2,4	2,6	2,6	2,0
4,8	1,8	4,1	4,5	5,3	4,3
5,6	4,5	3,9	4,4	5,2	5,0
2,3	2,5	2,1	2,3	2,4	2,1
3,7	3,8	3,5	4,3	4,5	3,9
36,3	37,7	36,7	39,7	32,0	39,8
61,2	60,4	50,0	62,4	70,0	62,6

F

ytica-----

II	III	III
6,6	7,2	6,8
72	48	48

-----Candida pulcherrima-----

II	III	III
5,9	5,1	5,6
96	72	72

-A. J. B. 1

TABLA XIII

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CREGER SOBRE ALCOHOL ETILICO

Aminoácidos	Gramos de aminoácidos por 100 gramos de proteínas									
	5,6	5,3	5,6	5,2	5,8	4,9	8,4	12,5	7,7	6,4
Alanina	4,4	4,4	4,5	4,1	4,1	3,3	3,7	3,6	4,4	4,1
Arginina	6,5	6,5	7,9	7,1	6,8	5,9	8,6	8,1	7,5	6,6
Acido aspártico	0	0	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5	0,3	0,9
Acido cisteico	2,3	0,4	0,6	0,4	0,5	0,5	0,3	0,4	0,7	0,6
Cistina	7,7	7,5	7,8	6,7	8,8	8,8	8,4	10,2	8,7	8,7
Acido glutámico	3,0	3,0	3,3	3,1	3,4	2,7	8,9	8,9	3,3	2,9
Glicina	2,8	3,1	2,7	2,7	2,4	2,1	2,0	2,1	2,8	3,1
Histidina	3,5	3,7	4,1	3,9	3,2	2,6	4,9	4,3	3,13	3,1
Isoleucina	5,5	5,3	6,2	5,8	5,2	4,3	1,3	1,1	5,3	4,6
Leucina	5,3	5,2	6,2	5,9	5,3	4,6	7,9	7,0	5,8	5,8
Lisina	1,6	1,1	1,5	1,4	1,1	0,8	1,1	0,9	1,0	0,8
Metionina	0,2	0,4	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2	0,3	0,5	0,4
Sulfóxido de metionina	5,1	2,9	5,2	3,4	2,9	2,5	2,3	2,0	2,8	2,6
Temilalanina	2,3	2,8	2,8	3,1	3,0	2,9	3,3	3,1	2,5	2,6
Erolina	2,6	1,9	3,8	3,8	4,0	3,5	5,0	4,7	3,9	4,2
Serina	3,2	3,4	4,2	3,9	4,1	3,3	5,1	4,5	4,2	4,3
Treonina	2,4	2,3	2,9	2,6	2,5	2,2	1,3	1,1	2,4	2,3
Tirosina	3,8	4,2	4,6	4,2	3,9	3,1	5,8	5,4	4,0	3,5
Valina	69,3	71,2	55,4	57,8	46,6	41,4	41,4	35,6	42,0	33,1
Total de proteínas (Nx6,25)	62,2	58,1	72,2	64,6	58,6	48,9	61,2	55,3	60,6	58,1
Indice de A.A.E.										
Condiciones de fermentación										

Levadura	G					H					
	Rhodotorula glutinis		Candida guilliermondii			Rhodotorula glutinis		Candida guilliermondii			
Hedio	I	II	III	I	II	I	II	III	I	II	III
cm ³ de EtOH	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Peso de células (g/l)	3,7	3,2	4,7	5,4	5,2	5,9	6,8	7,6	4,8	4,8	5,0
Tiempo de fermentación (horas)	72	48	72	72	96	96	48	48	48	48	48

TABLA XIII

DIVERSAS LEVADURAS HECHAS CRECEE

<u>Aminoácidos</u>	<u>Gramos de an</u>		
Alanina	5,6	5,3	5,6
Arginina	4,4	4,4	4,5
Acido aspártico	6,5	6,5	7,9
Acido cisteico	0	0	0,1
Cistina	2,3	0,4	0,6
Acido glutámico	7,7	7,5	7,8
Glicina	3,0	3,0	3,3
Histidina	2,8	3,1	2,7
Isoleucina	3,5	3,7	4,1
Leucina	5,5	5,3	6,2
Lisina	5,3	5,2	6,2
Metionina	1,6	1,1	1,5
Sulfóxido de metionina	0,2	0,4	0,3
Fenilalanina	3,1	2,9	5,2
Prolina	2,3	2,8	2,8
Serina	2,8	1,9	3,8
Treonina	3,2	3,4	4,2
Tirosina	2,4	2,3	2,9
Valina	3,8	4,2	4,6
Total de proteínas (Nx6,25)	69,3	71,2	55,4
Indice de A.A.E.	62,2	58,1	72,2

Condiciones de fermentación

Levadura	<u>G</u>		
	---Rhodotorula glutinis---		
Medio	I	II	III
cm ³ de EtOH	-----1,6-----		
Peso de células g/l	3,7	3,2	4,7
Tiempo de fermentación (horas)	72	48	72

31 JUL 1968

XIII

RECER SOBRE ALCOHOL ETILICO

de aminoácidos por 100 gramos de proteínas

5,2	5,8	4,9	8,4	12,5	7,7	6,4
4,1	4,1	3,3	3,7	3,6	4,4	4,1
7,1	6,8	5,9	8,6	8,1	7,5	6,6
0,2	0,3	0,2	0,2	0,5	0,3	0,9
0,4	0,5	0,5	0,3	0,4	0,7	0,6
6,7	8,8	8,8	8,4	10,2	8,8	8,7
3,1	3,4	2,7	8,9	8,9	3,3	2,9
2,7	2,4	2,1	2,0	2,1	2,8	3,1
3,9	3,2	2,6	4,9	4,3	3,13	3,1
5,8	5,2	4,3	1,3	1,1	5,3	4,6
5,9	5,3	4,6	7,9	7,0	5,8	5,8
1,4	1,1	0,8	1,1	0,9	1,0	0,8
0,4	0,1	0,2	0,2	0,3	0,5	0,4
3,4	2,9	2,5	2,3	2,0	2,8	2,6
3,1	3,0	2,9	3,3	3,1	2,5	2,6
3,8	4,0	3,5	5,0	4,7	3,9	4,2
3,9	4,1	3,3	5,1	4,5	4,2	4,3
2,6	2,5	2,2	1,3	1,1	2,4	2,3
4,2	3,9	3,1	5,8	5,4	4,0	3,5
57,8	46,6	41,4	41,4	35,6	42,0	33,1
64,6	58,6	48,9	61,2	55,3	60,6	58,1

H

s-----	-----Candida guilliermondii-----					
III	I	I	II	II	III	III
	-----1,6-----					
5,4	5,2	5,9	6,8	7,6	4,8	5,0
72	96	96	48	48	48	48



31

A partir de lo que antecede, es evidente que:

(1) aunque las levaduras son capaces de buen crecimiento sobre un hidrocarburo oxigenado en un medio simple de sales minerales, la adición de un factor de crecimiento (por ejemplo extracto de levadura) aumenta sustancialmente la velocidad de crecimiento, tal como se muestra en las tablas X, XI, XII y XIII, y (2), tal como se observará a partir de los datos precedentes, cada una de las levaduras cosechadas de acuerdo con este invento posee la valiosa combinación de alto contenido de proteínas, de alto contenido de aminoácidos esenciales y de composición de aminoácidos nutritivamente atractiva indicando así, además, la utilización de una levadura hecha crecer sobre un substrato hidrocarbonado oxigenado para producir una proteína utilizable, por biosíntesis de una manera extremadamente rentable. Así, el presente invento es especialmente útil para preparar suplementos para alimentos para hombres o para piensos de animales, que tienen un importante contenido de proteínas y valor nutritivo global.

Aunque los ejemplos precedentes ilustran el presente invento con gran detalle, se deberá recordar que el presente invento en sus aspectos más amplios no está limitado necesariamente a los substratos oxigenados específicos ni a las condiciones mostradas en estos ejemplos.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 14 de Septiembre de 1.967, bajo el número 667.750, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

1.7.68.

31 201-19068

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:

- 5 1.- Procedimiento de fermentación aerobia mejorado para la producción de un producto con alto contenido de proteínas, que comprende utilizar, como manantial principal de carbono, un hidrocarburo oxigenado obtenido a partir de una fracción de petróleo que tiene desde aproximadamente 1 a 30 átomos de carbono en la molécula, realizar el procedimiento de fermentación bajo condiciones aerobias utilizando un medio de crecimiento de sal inorgánica acuosa, mantener la temperatura dentro del margen de aproximadamente 20°C a 47°C, mantener el pH dentro del margen de aproximadamente 3,0 a 8,5, y utilizar un microorganismo seleccionado del siguiente grupo:

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS
	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	ATCC # 8766
	<i>Trigonopsis variabilis</i>	CBS # 1040
20	<i>Hansenula anomala</i>	CBS
	<i>Candida lipolytica</i>	ATCC # 8662
	<i>Candida pulcherrima</i>	ATCC # 9839
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ATCC # 2527
	<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC # 9390
	<i>Brevibacterium insectiphilium</i>	ATCC # 15528
25	<i>Pseudomonas ligustri</i>	ATCC # 15522

1.7.68.



	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	ATCC # 15523
	<i>Pseudomonas orvilla</i>	ATCC # 15524
	<i>Alcaligenes sp</i>	ATCC # 15525
	<i>Cellumonas galba</i>	ATCC # 15526
5	<i>Brevibacterium healii</i>	ATCC # 15527
	<i>Micrococcus cerificans</i>	ATCC # 14987
	<i>Sarcina sp</i>	QMB1518 Natick
	<i>Arthrobacter sp</i>	ATCC # 19140

10 y después de esto cosechar el producto con alto contenido de proteínas.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que dicho microorganismo es una levadura seleccionada del siguiente grupo, y en que el pH es mantenido dentro del margen de aproximadamente 3,0 hasta 7,5, y en que la temperatura es mantenida dentro del margen de aproximadamente 20°C hasta 40°C:

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS
	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	ATCC # 8766
	<i>Trigonopsis variabilis</i>	CBS # 1040
20	<i>Hansenula anomala</i>	CBS
	<i>Candida lipolytica</i>	ATCC # 8662
	<i>Candida pulcherrima</i>	ATCC # 9889
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ATCC # 2527
	<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC # 9390

25 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que dicho microorganismo es una bacteria seleccionada del siguiente grupo, y en que el pH es mantenido dentro del margen de 5,0 hasta 8,5, y en que la temperatura es mantenida dentro del margen de aproximadamente 25°C hasta 45°C:

30 1.7.68.



	Brevibacterium insectiphilium	ATCC # 15528
	Pseudomonas ligustri	ATCC # 15522
	Pseudomonas pseudomallei	ATCC # 15523
	Pseudomonas orvilla	ATCC # 15524
5	Alcaligenes sp	ATCC # 15525
	Cellumonas galba	ATCC # 15526
	Brevibacterium healii	ATCC # 15527
	Micrococcus cerificans	ATCC # 14987
	Sarcina sp	QMB1518 Natick
10	Arthrobacter sp	ATCC # 19140

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que dicho hidrocarburo oxigenado está seleccionado de la clase que consiste en alcoholes, aldehidos, ésteres, éteres, cetonas y ácidos.

15 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que dicho hidrocarburo oxigenado es una mezcla que consiste en alcoholes, aldehidos, cetonas y ésteres que contienen desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono en la molécula.

20 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que dicho hidrocarburo oxigenado comprende un alcohol que contiene desde aproximadamente 1 a 18 átomos de carbono en la molécula.

25 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, en que dicho alcohol consiste esencialmente en alcohol etílico.

30 8.- Procedimiento según la reivindicación 6, en que dicho alcohol está seleccionado de los siguientes: alcohol metílico, alcohol sec-butílico, alcohol isopropílico, alcohol n-butílico y alcohol cetílico.

1.7.68.



9.- Procedimiento según la reivindicación 4,
en que dicho hidrocarburo oxigenado consiste esencialmente en metil etil cetona.

5 10.- Procedimiento según la reivindicación 2,
en que la levadura es hecha crecer en la presencia de un medio nutriente que contiene extracto de levadura.

11.- Procedimiento según la reivindicación 3,
en que el microorganismo es *Micrococcus cerificans* (14.987).

10 12.- Procedimiento según la reivindicación 3,
en que el microorganismo es *Micrococcus cerificans* (14.987) y en que el hidrocarburo oxigenado es alcohol etílico.

15 13.- Un procedimiento de fermentación aerobia
continua para preparar un producto con alto contenido de proteínas, que comprende suministrar continuamente como manantial principal de carbono un hidrocarburo oxigenado obtenido a partir de una fracción de petróleo que tiene desde aproximadamente 1 a 30 átomos de carbono en la molécula, y suministrar continuamente un medio de crecimiento no restrictivo, líquido, acuoso, de sales inorgánicas, y gas que contiene oxígeno en exceso, a un reactor vigorosamente agitado que contiene dicho hidrocarburo oxigenado, dicho medio acuoso y un microorganismo previamente inoculado en dicho reactor, siendo mantenida la temperatura en dicho reactor dentro del margen de 20°C hasta 47°C, y siendo mantenido el pH de dicho reactor dentro del margen de 3,0 hasta 8,5, y en que dicho microorganismo está seleccionado del siguiente grupo:

30 *Saccharomyces cerevisiae* CBS
1.7.68.



	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	ATCC # 8766
	<i>Trigonopsis variabilis</i>	CBS # 1040
	<i>Hansenula anomala</i>	CBS
	<i>Candida lipolytica</i>	ATCC # 8662
5	<i>Candida pulcherrima</i>	ATCC # 9889
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ATCC # 2527
	<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC # 9390
	<i>Brevibacterium insectiphilium</i>	ATCC # 15528
	<i>Pseudomonas ligustri</i>	ATCC # 15522
10	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	ATCC # 15523
	<i>Pseudomonas orvilla</i>	ATCC # 15524
	<i>Alcaligenes sp</i>	ATCC # 15525
	<i>Cellumonas galba</i>	ATCC # 15526
	<i>Brevibacterium healii</i>	ATCC # 15527
15	<i>Micrococcus cerificans</i>	ATCC # 14987
	<i>Sarcina sp</i>	QMB1518 Natick
	<i>Arthobacter sp</i>	ATCC # 19140

y, después de esto, cosechar de forma continua el producto de alto contenido de proteínas.

20 14.- Procedimiento según la reivindicación 13, en que el tiempo de permanencia del líquido es desde aproximadamente 1,5 a 4 veces el tiempo mínimo de generación para el microorganismo particular.

25 15.- Procedimiento según la reivindicación 13, en que el gas que contiene oxígeno suministrado al reactor es desde aproximadamente 0,5 a 4 volúmenes de aire por volumen de líquido del reactor, por minuto, por porcentaje en peso de concentración de células secas en el reactor, y por tiempo de permanencia del líquido en horas.

30 16.- Procedimiento según la reivindicación 13,
1.7.68.

31



que comprende suministrar continuamente una mezcla de U,1
a 10% en peso de hidrocarburos oxigenados.

17.- Procedimiento según la reivindicación 16,
en que el microorganismo es *Micrococcus cerificans*
5 (14.987) y en que dicho substrato es alcohol etílico.

18.- Procedimiento según la reivindicación 13,
en que dicho microorganismo es una levadura seleccionada
del siguiente grupo, y en que el pH es mantenido dentro del
margen de aproximadamente 3,0 hasta 7,5, y en que la tem-
10 peratura es mantenida dentro del margen de aproximadamente
20°C hasta 40°C.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS
	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	ATCC # 8766
	<i>Trigonopsis variabilis</i>	CBS # 1040
15	<i>Hansenula anomala</i>	CBS
	<i>Candida lipolytica</i>	ATCC # 8662
	<i>Candida pulcherrima</i>	ATCC # 9889
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ATCC # 2527
	<i>Candida guilliermondi</i>	ATCC # 9390

19.- Procedimiento según la reivindicación 13,
en que dicho microorganismo es una bacteria seleccionada
del siguiente grupo, y en que el pH es mantenido dentro
del margen de 5,0 hasta 8,5 y en que la temperatura es man-
20 tenida dentro del margen de aproximadamente 25°C hasta
25 45°C.

	<i>Brevibacterium insectiphilium</i>	ATCC # 15528
	<i>Pseudomonas ligustri</i>	ATCC # 15522
	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	ATCC # 15523
	<i>Pseudomonas orvilla</i>	ATCC # 15524
30	<i>Alcaligenes sp</i>	ATCC # 15525

1.7.68.



	Cellulomonas galba	ATCC # 15526
	Brevibacterium healii	ATCC # 15527
	Micrococcus cerificans	ATCC # 14987
	Sarcina sp	QMB1518 Natick
5	Arthrobacter sp	ATCC # 19140

20.- Procedimiento según la reivindicación 13, en que dicho alcohol consiste esencialmente en alcohol etílico.

10 21.- Procedimiento según la reivindicación 18, en que la levadura es hecha crecer en presencia de un medio nutriente que contiene extracto de levadura.

22.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en que el tiempo de permanencia en el reactor es de 1,5 a 4 horas.

15 23.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en que la mezcla suministrada contiene de 0,5% a 5% del hidrocarburo oxigenado, y el aire enriquecido con oxígeno contiene hasta 90% de oxígeno.

20 24.- Procedimiento de fermentación aerobia mejorado para la producción de un producto con alto contenido de proteínas que comprende utilizar, como manantial principal de carbono, un hidrocarburo oxigenado obtenido a partir de una fracción de petróleo que tiene desde aproximadamente 1 a 30 átomos de carbono en la molécula, realizar el procedimiento de fermentación bajo condiciones aerobias, utilizar un medio de crecimiento de sal inorgánica acuosa, mantener la temperatura dentro del margen de aproximadamente 20°C hasta 47°C, mantener el pH dentro del margen de aproximadamente 3,0 a 8,5, y utilizar un micro-
25 organismo y, después de esto, cosechar el producto con

30
1.7.68.

31 JUL



alto contenido de proteínas.

25.- Procedimiento de fermentación aerobia me
jorado para la producción de un producto con alto conteni
do de proteínas.

5

Tal y como se ha descrito en la Memoria que
antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cincuenta y cinco hojas
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

31 JUL 1968

P. A.

Alfredo de Elzabara
Por Poder

G.D.S.
1.7.68.