

360992



PATENTE DE INVENCIÓN

por 20 años

por "Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo" --
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 invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de un microorganismo.

Según la presente invención se provee 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 y en presencia de un gas que contiene oxígeno libre, siendo dicha fracción de petróleo y dicho medio acuoso continuamente alimentado a un fermentador conteniendo dicho microorganismo y en el cual toma lugar una primera etapa de cultivo de dicho microorganismo, una corriente de producto comprendiendo el microorganismo siendo pasada continuamente a una segunda etapa fermentadora, en la cual el microorganismo es tratado con una segunda etapa de medio nutriente acuoso, una corriente de produc-



to comprendiendo el microorganismo siendo continuamente separada de la segunda etapa fermentadora, siendo dicho producto tratado para recuperar el microorganismo, en la primera etapa de cultivo la cantidad de nutrientes esenciales en la fase acuosa en la primera etapa fermentadora siendo tal que la proporción de desarrollo del microorganismo no es impedida por escasez de nutrientes y en la segunda etapa la cantidad de a lo menos un nutriente de la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora siendo menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo del microorganismo y, o, a lo menos un nutriente que está presente en la fase acuosa de la primera etapa fermentadora estando ausente de la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora.

Preferiblemente el medio nutriente acuoso de la segunda etapa consiste de una mezola de todo o parte del medio nutriente acuoso de la primera etapa separado de la primera etapa fermentadora junto con agua adicional. Si se desea el agua adicional puede contener nutrientes tales como por ejemplo sales minerales nutrientes.

Preferiblemente la cantidad de agua que es adicionada a la segunda etapa fermentadora o que es mezclada con una corriente de alimento a la segunda etapa fermentadora es suficiente para reducir el nivel de cualquier toxina producida en el medio nutriente acuoso de la primera etapa de modo tal que dicha toxina no impida substancialmente el desarrollo en la segunda etapa. Más particularmente es preferido que la cantidad de agua que es adicionada sea tal que la proporción total por peso de dichas toxinas en el efluente de la



segunda etapa no sea mayor que la proporción de dichas toxinas en el efluente de la primera etapa.

Preferiblemente la cantidad de agua que es adicionada a la segunda etapa fermentadora o que es mezclada con la corriente de alimento a la segunda etapa fermentadora es tal que la proporción de dilución de la operación en el segundo fermentador no es inferior que la proporción de dilución de la operación de la primera etapa fermentadora. Evidentemente la cantidad de agua adicionada debe así depender de la proporción de volúmenes efectivos de la primera etapa y segunda etapa fermentadoras; en ciertos casos será evidente que la deseada proporción de dilución será conseguida en el segundo fermentador sin la adición de agua. No obstante, ya que es también deseable mantener un bajo nivel de toxinas en la segunda etapa fermentadora a través de adición de agua, la combinación del control de proporción de dilución, como se ha descrito, y la reducción de nivel de toxinas conducirá al uso de un fermentador más grande en la segunda etapa que aquel empleado en la primera etapa. Generalmente, pero no necesariamente, la proporción de agua adicionada será 1-8 veces, y preferiblemente 1-5 veces el volumen por proporción alimentada por hora de corriente de producto del primero al segundo fermentador.

Cuando el medio nutriente acuoso de la segunda etapa consiste totalmente del medio nutriente acuoso de la primera etapa que es separado de la primera etapa fermentadora junto con un volumen substancialmente igual de agua, el volumen efectivo de la segunda etapa fermentadora debe preferiblemente ser substancialmente dos veces el volumen efectivo de la primera etapa fermentadora.



Por selección de la proporción de dilución de la segunda etapa como se ha descrito, la proporción de desarrollo del microorganismo en la segunda etapa puede ser mantenida a un nivel aceptable no obstante la escasez de uno o más constituyentes. 5 nutrientes y en general se provee un proceso que es aceptablemente eficiente en términos de utilización de nutrientes y en términos de general desarrollo de microorganismos en relación a proyección y operación variables.

Lo más conveniente es que el tiempo de presencia en el fermentador de la segunda etapa sea 1-10 horas y de preferen- 10 cis menos que 3-4 horas.

El término "toxina" es usado aquí con referencia a cualquier material, producido en el curso del desarrollo del microorganismo que retarde el desarrollo del microorganismo.

15 El término "proporción de dilución" es usado aquí con referencia a la relación de la proporción total de fase líquida alimentada (en volumen por unidad de tiempo) a un fermentador al volumen operacional del fermentador.

Si se desea las dos etapas pueden ser operadas con una 20 proporción de alimento de un componente o ion del nutriente acuoso a cada etapa de modo tal que el nutriente acuoso gastado de la segunda etapa es efectivamente agotado del componente o ion. Llevando así a una mejora en la economía del procedimiento ya que las condiciones pueden ser dispuestas para dar la 25 más efectiva utilización de un nutriente o nutrientes con relación al rendimiento de microorganismos. Por ejemplo la cantidad de tales nutrientes como fosfato o potasio presentes en el medio acuoso gastado puede ser reducida a un mínimo. En particular la completa utilización de iones potasio puede ser lograda.



Todas las etapas del procedimiento pueden ser efectuadas ya de modo continuo o ya de forma discontinua.

El procedimiento incluyendo etapas facultativas del mismo será ahora descrito con mayor detalle.

5 Microorganismos que son cultivados como se ha descrito pueden ser levaduras, mohos o bacterias. Con el término "microorganismos" usado aquí nosotros incluimos las mezclas de microorganismos.

10 Preferiblemente cuando una levadura es empleada ésta es de la familia Cryptococcaceae y particularmente de la subfamilia Cryptococcoideae, no obstante, si se desea, pueden ser usadas, por ejemplo levaduras ascosporogéneas de la subfamilia Saccharomycetoideae. El género preferido de la subfamilia Cryptococcoideae son Torulopsis y Candida. Las especies preferidas de levadura son las siguientes. En particular es preferido usar la provisión específica indicada con números de referencia; estos números de referencia se refieren a la provisión CBS en posesión del Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda; a la provisión CMI en posesión del
15 Commonwealth Mycological Institute, Kew, Inglaterra; y a la provisión NCYC en posesión del National Collection De Yeast
20 Cultures, Nutfield, Inglaterra.

	<u>Especies</u>	<u>Linajes preferidos</u>
	Candida brumptii	
25	" catenulata	
	" clausenii	
	" humicola	
	" intermedia	
	" krusei	



- Candida lipolytica CBS N^o. 2078; N^o. 599
CMI N^o. 93743
NCY N^o 376; N^o 153
- " melibiosi
- " parapsilosis CMI N^o 83350. NCYC N^o 458
- 5 " pulcherrima
- " rugosa
- " stellatoidea
- " tropicalis NCYC N^o 4
- " utilis CMI N^o 2331

10 Debaryomyces kloeckeri

Hansenula anomala

Pichia guilliermondii CBS N^o. 2084; N^o 2031

Rhodotorula glutinis

Torulopsis famata

15 " magnoliae

De las indicadas la Candida lipolytica y la Candida tropicalis son particularmente preferidas.

Si se desea el microorganismo puede ser un moho.

20 Los mohos convenientes son de la familia Moniliaceae; un género conveniente es el Penicillium y preferiblemente se usa el penicillium expansum. Otro género conveniente es el Aspergillus.

Si se desea el microorganismo puede ser una bacteria.

25 Las bacterias convenientes son de uno de los órdenes: Pseudomonadales, Eubacteriales y Actinomycetales.

Preferiblemente las bacterias que son empleadas son de las familias Corynebacteriaceae, Micrococcaceae, Achromobacteraceae, Actinomycetaceae, Rhizobiaceae, Bacillaceae y Pseudomonadaceae.

Las especies preferidas son las Bacillus megaterium, Bacillus subtilis y Pseudomonas aeruginosa. Otras especies que pueden ser empleadas incluyen:



- Achoromobacter sp.
- Brevibacterium sp.
- Corynebacterium sp.
- Flavobacterium sp.
- 5 Micrococcus sp.
- Pseudomonas sp.
- Mycobacterium smegmatis
- " sp.
- Nocardia erythropolis
- 10 " minima
- " opaca
- " polychromogenes
- " rubra
- " rubropertincta
- 15 Streptomyces griseolus
- " rimosus
- " sp.

Estas bacterias se desarrollan en presencia del medio nutriente acuoso siguiente:

20	NH ₄ Cl	0.5 gramos
	NaCl	4 "
	MgSO ₄	0.5 "
	Na ₂ HPO ₄	0.5 "
	KH ₂ PO ₄	0.5 "
25	agua hasta alcanzar los	1000 mls.

De preferencia el pH del medio es mantenido a 7.

Un medio nutriente conveniente para las levaduras y mohos tiene la composición siguiente:



- 8 -

	Fosfato diamónico ácido	2 gramos
	Cloruro potásico	1.15 "
	Sulfato magnésico 7H ₂ O	0.65 "
	Sulfato de cinc	0.17 "
5	Sulfato de manganeso 1H ₂ O	0.045 "
	Sulfato ferroso 7H ₂ O	0.068 "
	Agua corriente	200 "
	Extracto de levadura	0.025 "
	Agua destilada (hasta alcanzar 1000 mls).	

10 El desarrollo del microorganismo usado es favorecido por la adición al medio de cultivo de una proporción muy pequeña de extracto de levadura (un producto industrial rico en vitaminas del grupo B obtenido por hidrólisis de una levadura) o más generalmente la esencial levadura nutrilites.

15 La esencial levadura nutrilites comprende biotina, tiamina, inositol, ácido nicotínico, ácido pantoténico y piridoxina. La cantidad de extracto de levadura requerido es preferiblemente del orden de 25 partes por millón con referencia al medio de fermentación acuoso. La cantidad de tal nutrilites va-

20 ría entre 0.1 parte por millón para la biotina a 10 partes por millón para el inositol.

Preferiblemente el medio nutriente acuoso es mantenido a un deseado pH por intermitente o continua adición de un medio acuoso de elevado valor pH. Generalmente, cuando se

25 usan mohos o levaduras y en particular cuando se usa la *Candida tropicalis*, el pH del medio nutriente debe ser mantenido en el orden 3-6 y de preferencia en el orden 4-5. (La bacteria requiere un pH más elevado generalmente 6.5-8). Materiales alcalinos convenientes para la adición a la mezcla de



desarrollo incluyen el hidróxido sódico, el hidróxido potásico, el fosfato disódico hidrogenado y el amoniaco, ya libres o en solución acuosa.

5 La temperatura óptima de la mezola de desarrollo debe variar de acuerdo con el tipo de microorganismo empleado y debe generalmente hallarse en el orden 25-35°C. Cuando se usa *Candida tropicalis* el orden de temperatura preferido es 28-32°C.

10 La toma de oxígeno es esencial para el desarrollo del microorganismo. El oxígeno debe generalmente ser suministrado como aire. Con el fin de mantener una rápida proporción de desarrollo, el aire, usado para suministrar oxígeno, habrá de estar presente en forma de finas burbujas bajo la acción de agitación. El aire puede ser introducido a través
15 de una superficie aglomerada. No obstante puede ser usado el sistema de íntima aireación conocido como "aireación torbellino".

Tan del medio nutriente acuoso como sea posible es separado del microorganismo por medio de decantación. Adicionalmente o alternativamente la separación es activada por
20 centrifugación. La fracción resultante conteniendo el microorganismo es entonces lavada con agua y sometida a un nuevo proceso de separación tal como centrifugación o decantación. Esta secuencia de lavado y separación es repetida hasta que
25 la deseada cantidad de nutriente residual ha sido separada de la fracción que contiene el microorganismo. Los lavados, con o sin ulterior tratamiento, pueden ser devueltos a la operación de desarrollo.

El microorganismo es entonces de preferencia secado



y sometido a extracción disolvente. Preferiblemente la extracción disolvente es efectuada empleando un disolvente que consiste de o contiene un hidrocarburo, preferiblemente el hidrocarburo tiene 4-7 átomos de carbono por molécula. Preferiblemente el hidrocarburo es una parafina y preferiblemente la parafina es una parafina de cadena recta. El pentano normal y el hexano normal son convenientes disolventes.

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

Si se desea puede ser usada una etapa de extracción usando, como disolvente, una mezcla de un hidrocarburo con, por ejemplo, etanol, e isopropanol. Así puede ser usado un disolvente consistiendo de 80% por peso de hexano y 20% por peso de etanol o isopropanol.

Los hidrocarburos recuperados en la fase extracto por extracción disolvente, si metabolizan, pueden ser reciclados a la etapa de cultivo del microorganismo.

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

Según una característica preferida de esta invención se suministra un procedimiento que comprende el cultivo de un microorganismo de una manera aquí antes descrita en presencia de una fracción del petróleo que consiste en parte de hidrocarburos de cadena recta y teniendo un peso medio molecular que corresponde a lo menos 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 un lado, el microorganismo y, por otro lado, una fracción del petróleo que tiene una proporción reducida de hidrocarburos de cadena recta o que está libre de dichos hidrocarburos de cadena recta y después tratamiento del microorganismo como aquí antes se ha descrito.

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 a un producto valorable.

Generalmente los hidrocarburos de cadena recta estarán presentes en el material de carga según la invención como parafinas; no obstante, los hidrocarburos de cadena recta pueden estar presentes como olefinas; también puede ser usada una mezcla conteniendo parafinas de cadena recta y olefinas.

Por la aplicación de este procedimiento bajo condiciones que limiten la asimilación de los hidrocarburos de cadena recta es posible operar con la separación de solamente una deseada proporción de estos hidrocarburos.

Materiales de carga convenientes para el procedimiento de la invención incluyen la kerosina, los gasoils y los aceites lubricantes, estos materiales de carga pueden estar sin refinar o pueden haber pasado por algún tratamiento de refinación, pero deben contener una proporción de hidrocarburos de cadena recta en el orden de cumplir el propósito de la presente invención. Convenientemente la fracción del petróleo debe con-



tener 3-45% por peso de hidrocarburos de cadena recta.

Los métodos preferidos para usar en el cultivo del microorganismo y para la recuperación del producto están descritos en las patentes británicas números 914.567, 914.568, 1017584, 1017585, 1021697, 1021697, 1021698, 1049065, 1049066, 1049067, 1049929, 1059891 y en la 105881 hasta la 105890, así como en las solicitudes de patente correspondientes a los números provisionales: 45005/63, 45009/63, 38942/63, 27284/65, 44380/65, 4763/66, 4765/66, 5640/66, 2580/67, 2582/67, 33087/67, 33088/67.

La invención es ilustrada, sin carácter alguno limitativo, con referencia al siguiente Ejemplo; los experimentos 1 y 2 son dados con el propósito de comparación.

EJEMPLO

Una levadura, *Candida tropicalis*, fué desarrollada en un continuamente operado primer fermentador (F.1) de 6.3 metros cúbicos de volumen de trabajo en presencia de un medio nutriente acuoso teniendo la siguiente composición

	H ₃ PO ₄	1,55 gramos/litro	
	KCl	0.93	" "
20	Mg(OH) ₂	0.063	" "
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.02	" "
	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.048	" "
	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.126	" "
	extracto de levadura	0.05	" "
25	H ₂ SO ₄	1.72	" "
	agua hasta los	1000 ml.	

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



Gravedad específica	0.866
Punto de fluidez	+ 12°C.
Orden de ebullición	270 - 350°C

5 180 gramos de este gasoil material de carga fueron mezclados con cada litro de medio nutriente acuoso. Esta mezcla fue alimentada al fermentador a la proporción de 1260 litros por hora.

El fermentador fue mantenido a 30°C y a un pH de 4,2 por continua admisión de amoníaco gaseoso. La aireación fue a razón de 120 v/v/hr. usando una agitadora de torbellino.

10 La cantidad total de corriente de producto separada continuamente, es decir 1260 litros por hora, fue pasada a un segundo fermentador F2 teniendo un volumen de trabajo de 12.4 metros cúbicos.

15 A esta corriente de producto de 1260 litros por hora fueron adicionados 49 litros por hora de gasoil y 2.850 litros por hora de agua dulce y la mezcla alimentada al segundo fermentador el cual fue mantenido a 30°C y aireado a la razón de 40 v/v/hr. usando una agitadora de torbellino.

20 La corriente de producto en su totalidad (1260 litros por hora) fue separada continuamente y pasada a una segunda etapa fermentadora (F.2) cuyo fermentador tenía un volumen de trabajo de 12.4 metros cúbicos.

25 El segundo fermentador fue mantenido a 30°C y aireado a la razón de 40 v/v/hr. usando agitadora de torbellino, manteniendo una proporción de dilución de 0.33 v/v/hr.

Una corriente de producto fue continuamente descargada del segundo fermentador y decantada 65% por peso de la fase acuosa fue continuamente separada y reemplazada por 65% por peso de agua corriente.



0.8 kilogramos de Laural 746 (nombre registrado de un detergente aniónico obtenido por condensación de una mezcla de alcohol laurico con óxido de etileno, y sulfatando luego el producto) fueron adicionados a cada metro cúbico de la
5 mezcla de levadura, petróleo residual y agua.

Esta mezcla fué a fondo agitada y centrifugada para obtener, como productos separados, una pasta de levadura, una fase acuosa y una fase gasoil.

La pasta de levadura fué remezclada con agua corriente
10 a una proporción de 1 parte por peso de materia seca por 10 partes por peso de agua y a fondo agitada y otra vez centrifugada.

La pasta de levadura que fué así recuperada contenía
15 65 a 70% por peso de agua. Esta pasta fué secada en un deshidratador de aspersion. El contenido de humedad de la levadura a la salida del secador fué 5% por peso.

Este producto fué entonces llevado a un tren de extracción continua operando a contracorriente con tres etapas. A este sistema fué alimentado (a la primera etapa) 1 parte
20 de la levadura del secador de aspersion por 8 partes de una mezcla de IPA/agua azeotrópica (12% agua-88% IPA) (alimentada al final de la etapa). Cada etapa fué mantenida a 80°C con agitación. La levadura recuperada de la etapa final fué humedecida con contenido de agua de 25% en peso y fué llevada a
25 un carro-secador.

La levadura fué pasada desde la parte superior a la del fondo del secador y los conglomerados formados durante este secamiento fueron deshechos.

Los datos de operación y resultados obtenidos se mues-



tran en la siguiente Tabla.

Experimentos 1 y 2

Por vía de contraste dos pruebas separadas (Experimentos 1 y 2) fueron efectuadas usando un único fermentador. El procedimiento fué como sigue:

5

Experimento 1

Una levadura, *Candida tropicalis*, fué desarrollada en un fermentador operado continuamente (F.1) de 6,3 metros cúbicos de volumen de trabajo en presencia de un medio nutriente acuoso teniendo la composición siguiente:

10

H_3PO_4	1,55 gramos por litro			
KCl	0,93	"	"	"
$Mg(OH)_2$	0.063	"	"	"
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.02	"	"	"
15 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.048	"	"	"
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.126	"	"	"
Extracto de levadura	0.05	"	"	"
H_2SO_4	1.72	"	"	"
Agua corriente hasta	1000 ml.			

20

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

25

gravedad específica	0.866
punto de fluidez	+ 12°C
orden de ebullición	270-350°C

El material de carga gasoil fué alimentado a razón de 270 litros por hora; el medio nutriente acuoso a la razón de 980 litros por hora.



El fermentador fué mantenido a 30°C y a pH:4,2 por admisión continua de amoníaco gaseoso; la proporción de aireación fué 765 metros cúbicos por hora, y la proporción de dilución fué 0.2 v/v/hora.

5 Una corriente de producto de 1250 litros por hora fué continuamente descargada del fermentador y sometida a decantación 65% por peso de la fase acuosa decantada fué continuamente separada y reemplazada por 65% por peso de agua corriente.

10 0.8 kilogramos de Laurel 746 fueron adicionados por cada metro cúbico de la mezcla de levadura, petróleo residual y agua.

15 Esta mezcla fué a fondo agitada y centrifugada para obtener como productos separados: una pasta de levadura, una fase acuosa, y una fase gasoil.

La pasta de levadura fué después mezclada de nuevo con agua corriente a una proporción de 1 parte por peso de materia seca por 10 partes por peso de agua y a fondo agitada y otra vez centrifugada.

20 La pasta de levadura recuperada contenía 65 a 70% por peso de agua. Esta pasta fué entonces llevada a un secador de aspersión, a la salida del cual el producto obtenido contenía cerca de 5% de agua.

25 Este último producto fué luego llevado a un tren de extracción continua operando como se ha descrito en el Ejemplo 1. La levadura recuperada a la salida del tren de extracción continua fué mojada con el fin de obtener un contenido de agua de 25% por peso y fué luego llevada a un carro-secador.



La levadura fué pasada de la parte superior (a una temperatura de 60°C) a la parte inferior o fondo del secador (a una temperatura de 110°C) y los conglomerados formados durante este secamiento final fueron deshechos.

5 Los datos de operación y resultados obtenidos están mostrados en la siguiente Tabla.

EXPERIMENTO 2

10 Una prueba similar a aquella descrita en el Experimento 1 fué efectuada en un fermentador operando continuamente (F.2) de 12,4 metros cúbicos de volumen de trabajo: en presencia del medio nutriente acuoso dado en el Experimento 1.

15 Las condiciones de operación, recolección y extracción disolvente de la levadura fueron efectuadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Experimento 1 con las diferencias que son ilustradas por los datos de operación dados en la siguiente Tabla.



T A B L A

	Experimento 1: Fermentador 1 solo	Experimento 2: Fermentador 2 solo	Ejemplo 1: Fermentadores en serie	
			Fermentador 1	Fermentador 2
Volumen de trabajo:	m ³ : 6.3	12.4	6.3	12.4
Proporción de dilución individual:	v/v/hr: 0.2	0.2	0.2	0.3
Proporción de dilución general:	v/v/hr: 0.2	0.2		0.22
Temperatura:	°C : 30	30	30	30
pH:	: 4.2	4	4.2	4.2
Aireación:	v/v/hr: 120	80	120	40
Proporción específica: Gasoil puro:	g/l : 65	63	180	proporción adicional: da (49)
Proporción general:	g/l : "	"		65
Medio nutriente puro: fósforo:	g/l : 0.505	0.510	0.505	sin adición de nutriente fresco
Potasio:	g/l : 0.488	0.480	0.488	0.00
Proporción de producto:	kg/hr: 9.5	11	10	19.2
Proporción general:	kg/hr: "	"		19.2
Medio nutriente usado: fósforo:	g/l : 0.340	0.300	0.350	0.155
Potasio:	g/l : 0.170	0.188	0.170	Nada
Datos analíticos del producto:	% en peso en base seca:			
Nitrógeno:	" : 10.9	11.0	10	12
Total de lípidos:	" : 0.8	0.9	16	0.5
Fósforo:	" : 1.75	1.9	1.6	1.6
Potasio:	" : 2.3	2.2	2.3	1.81



N O T A

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, caracterizado por el hecho que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de una fracción del petróleo que consiste total o en parte de hidrocarburos de cadena rec-
ta, en presencia de un medio nutriente acuoso y en presencia
10 de un gas que contiene oxígeno libre, dicha fracción del petróleo y dicho medio nutriente siendo continuamente alimentado a un fermentador que contiene dicho microorganismo y donde toma lugar una primera etapa de cultivo de dicho microorganismo, una corriente del producto comprendiendo el microorganismo siendo continuamente pasada a una segunda etapa fermentadora, en
15 la cual el microorganismo es tratado con una segunda etapa de medio nutriente acuoso, una corriente del producto comprendiendo el microorganismo siendo continuamente separada de la segunda etapa fermentadora, siendo dicho producto tratado para recuperar el microorganismo, en la primera etapa de cultivo
20 la cantidad de nutrientes esenciales de la fase acuosa de la primera etapa fermentadora siendo tal que la proporción de desarrollo del microorganismo no es impedida por escasez de nutrientes y en la segunda etapa la cantidad de a lo menos un nutriente de la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora siendo menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo del microorganismo y, o, a lo menos un nutriente de los que está presente en la fase acuosa de la primera etapa fermentadora estando ausente de la fase acuosa de la segunda
25 etapa fermentadora.



2.- Un procedimiento, tal como el especificado en 1, caracterizado por el hecho que en la segunda etapa el medio nutriente acuoso consiste de una mezcla de todo o parte del medio nutriente acuoso separado de la primera etapa fermentadora junto con agua adicional.

3.- Un procedimiento, tal como el especificado en 2, caracterizado por el hecho que la proporción de adición de agua es 1 a 5 veces el volumen por hora de la proporción de la corriente de producto alimentada desde la primera etapa fermentadora a la segunda etapa fermentadora.

4.- Un procedimiento, tal como el especificado en 2 o 3, caracterizado por el hecho que la cantidad adicional de agua es suficiente para reducir el nivel de toxina producida en el medio nutriente acuoso de la primera etapa tal que dicha toxina no debe substancialmente impedir el desarrollo de la segunda etapa.

5.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el producto líquido total separado de la primera etapa fermentadora, dicho producto conteniendo en suspensión el producto microorganismo, es pasado a la segunda etapa fermentadora.

6.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que la proporción de dilución usada en la operación de la segunda etapa fermentadora no es inferior que la proporción de dilución usada en la operación de la primera etapa fermentadora.

7.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cual-



5
quiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el nutriente que está presente lo está en una cantidad que es menor que la cantidad requerida para no impedir el desarrollo en la segunda etapa fermentadora o que está ausente de la fase acuosa de la segunda etapa fermentadora es el potasio.

8.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una levadura.

10
9.- Un procedimiento, tal como el especificado en 8, caracterizado por el hecho que la levadura es de la familia Cryptococcaceae.

15
10.- Un procedimiento, tal como el especificado en 9, caracterizado por el hecho que la levadura es del género Candida.

11.- Un procedimiento, tal como el especificado en 10, caracterizado por el hecho que la levadura es *Candida tropicalis*.

20
12.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que la fracción del petróleo consiste, total o en parte, de hidrocarburos de cadena recta que tienen un peso medio molecular correspondiente a lo menos a 10 átomos de carbono por molécula.

25
13.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que la fracción del petróleo es un gasoil.

14.- Un procedimiento, tal como el especificado en 1 y substancialmente como se ha descrito en el Ejemplo aportado.



15.- "Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo".

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

Barcelona, 25 de Noviembre de 1968.