

373678

23 FEB.



P.-43.227

F-7236

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA	_____
CLASIFICACION I. P. C.	_____
CLASE <u>C12</u>	_____
SUBCLASE <u>D</u>	_____

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de MOBIL OIL CORPORATION

entidad / ~~de~~ nacionalidad norteamericana

con domicilio en 150 East 42nd Street, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de América

por: "UN METODO PARA CULTIVAR UN MICROORGANISMO AEROBIO"
(Clase Internacional C12d)

**POOR
QUALITY**

194



Esta invención se refiere al cultivo de microorganismos.

5 El cultivo de microorganismos es interesante porque muchos de ellos son capaces de sinterizar - proteínas y otros materiales útiles. Estas proteínas son adecuadas para uso como alimento o componentes de alimentos para ganado y otros animales, así como para el hombre. El aumento de la velocidad de reproducción de los microorganismos, por lo tanto, puede significar un aumento en la producción de proteínas.

10 Pueden utilizarse dispositivos mecánicos para agitar la mezcla de cultivo; o bien, como alternativa, aire a alta presión para agitar y suministrar oxígeno a la mezcla. Por lo que se sabe hasta ahora, no se ha empleado aire a baja presión en procedimientos de cultivo microbiano.

20 De acuerdo con la invención, se proporciona un método de cultivo de microorganismos por incubación de los mismos en una mezcla de cultivo que comprende un nutriente mineral acuoso y una fuente de carbono para el suministro de energía y el crecimiento. Se hace pasar a través de la mezcla aire a baja presión, preferiblemente en el campo de 12,7 a 50,8 mm. de mercurio, para agitar la misma y para suministrar el oxígeno necesario. En comparación con el cultivo microbiano convencional empleando agitadores mecánicos, la energía consumida en el presente procedimiento es sólo de 1/15 a 1/3 de la utilizada en procedimientos convencionales, en tanto que los rendimientos en células son la menos comparables. La fuente de carbono que se utiliza en el procedimiento es preferible-

14.11.69

373678

1960



mente un hidrocarburo, utilizado junto con un microorganismo que consume hidrocarburo.

5 La invención es aplicable preferiblemente a cualquier especie microbiana aerobia que sea capaz de utilizar un hidrocarburo como fuente, preferiblemente como fuente única, de carbono para la producción de energía y para el crecimiento, incluyendo especies que utilizan hidrocarburos de bacterias, hongos, levaduras y mohos. Se prefieren organismos no delicados, es decir, aquellos que pueden reproducirse en medios simplificados de sales sin necesidad de adiciones de compuestos orgánicos. Se excluyen las especies que son agentes patógenos activos en los animales o en el hombre.

10 Un microorganismo seleccionado se incubaba en una mezcla de un nutriente mineral acuoso y un hidrocarburo para formar una mezcla de cultivo, y se suministra oxígeno a esta mezcla haciendo pasar un gas que contiene oxígeno, preferiblemente aire, a través de ella. El gas sirve también para agitar la mezcla, y preferiblemente comprende el único medio para esta finalidad. Tiene otros efectos, como se indicará más adelante. Para un procedimiento por cargas, se cultivan las células a lo largo de un período de tiempo que se puede medir convenientemente por la velocidad de reproducción; es decir, que cuando dicha velocidad se nivela, se interrumpe el procedimiento y se recogen las células; para un procedimiento continuo, las células pueden recogerse continuamente y añadirse también continuamente el nutriente. El cultivo se lleva a cabo a temperaturas convencionales, de 20 a 55°C, preferiblemente de 30 a 40°C.

14.11.69

373678



La presión del aire que entra en la mezcla de cultivo se mantiene preferiblemente en un valor bajo comprendido entre 6,35 y 50,8 mm., de mercurio (manométricos), aunque se utilizan también valores algo más altos, que llegan hasta 15 cm de mercurio. El campo preferido de 5
12,7 a 50,8 mm. de mercurio es inferior a 0,07 kg/cm² manométricos, correspondiendo aproximadamente a 0,017 - 0,069 kg/cm² manom. a 15,6°C. Se ha encontrado que en este campo de presión es preferido es posible una economía clara y -
10 sorprendente con respecto a la energía requerida para llevar a cabo la fermentación, a saber, sólo aproximadamente de 1/15 a 1/3 de la requerida en un procedimiento similar pero en el que la agitación se efectúa por medio de agitadores mecánicos o aire a presión elevada; y al mismo tiempo
15 se obtienen características de cultivo excelentes y una productividad microbiana comparable. A presiones de aire de 15 cm de mercurio aproximadamente, las necesidades de energía son sólo aproximadamente la mitad de las requeridas en dicho procedimiento similar que utilice agitadores mecánicos o aire a presión elevada.
20

Hasta ahora, en las fermentaciones aerobias se pensó que un a elevada velocidad de cizallamiento, como la producida por agitación mecánica, y una agitación intensa eran requisitos previos para la creación de superficies
25 y para contribuir al transporte de oxígeno al sistema. Y en el caso de agitación por medio de aire, se creía que - había que utilizarse aire a alta presión (p. ej., de 1,76 a 2,11 kg/cm² manom.) para obtener una buena distribución a través de los tubos de borboteo y para un buen control
30 y reproducibilidad de las condiciones. En contradicción



con esta técnica y creencia anterior, pueden conseguirse a las muy bajas presiones de aire descritas una buena agitación de la mezcla de cultivo, junto con una distribución satisfactoria del aire a través de los tubos de borboteo y un control y reproducibilidad satisfactorios.

5
10
15
20
25

Con respecto a la energía total consumida, el Ejemplo 1 siguiente muestra, en una mezcla de cultivo con bajo contenido de aceite agitada por aire a baja presión, una cifra de 0,44 kwh consumidos por kilogramo de producto de células secas; esta cifra debe compararse con una operación comparable, excepto que en la misma se empleó agitación mecánica, en la cual se consumieron 1,32 kwh. En el Ejemplo 2, en el cual se utilizó una mezcla de cultivo con alto contenido de aceite, el consumo de energía con aire a baja presión descendió a 0,088 kwh. Así pues, es evidente que se puede conseguir un consumo de energía esencialmente reducido por kilogramo de producción de células. En este sentido, debe entenderse que el término "energía total", aplicado al presente procedimiento, incluye la energía para agitar la mezcla de cultivo, más la energía requerida para la compresión del aire y el bombeo del mismo, y para el enfriamiento de la mezcla. Son evidentes ulteriores economías en el aparato requerido, al no haber necesidad de agitadores mecánicos ni de medios para mover los mismos.

Un aparato para el cultivo de microorganismos se ilustra en los dibujos, en los cuales,

30

la Fig. 1 es una vista desmontada, parcialmente en corte, de una cuba de fermentación, mostrando el conducto central de suministro de aire;

373678



la Fig. 2 es una vista en corte de la Fig. 1 tomada a lo largo de la línea 2-2; y

la Fig. 3 es una vista similar a la Fig. 1 pero mostrando una modificación.

5

En la Fig. 1, 10 es un conducto de suministro de aire a baja presión, dispuesto centralmente y que se extiende esencialmente en dirección vertical, cuyo diámetro es de una magnitud importante en comparación con el de otros conductos asociados con el aparato. Dispuesta por fuera y alrededor del conducto 10, y concéntrica con el mismo, hay una cámara de fermentación 11 vertical y - prácticamente cerrada, de forma anular, adecuadamente soportada con respecto al conducto 10, p. ej., por medio del soporte 12. Una pluralidad de tubos provistos de válvulas 13-18 que se extienden radialmente y que están separados en el sentido de la circunferencia, conectan el conducto con la cámara y suministran aire a baja presión a esta última en una pluralidad de puntos. Como se muestra en la Fig. 2, estos tubos están dispuestos simétricamente con respecto a la cámara y al conducto central 10, con lo que se reducen al mínimo las distancias de recorrido del aire y las pérdidas de presión. Cada uno de los tubos tiene un extremo de entrada de aire, dos de los cuales se muestran en 19 y 20, dispuesto por encima del nivel 21 de la mezcla de cultivo en la cámara 11 con objeto de evitar un posible retroceso de tal mezcla al conducto 10; y cada tubo tiene un extremo de descarga del aire, indicado por - 22-27 en la Fig. 2, situado contiguo al fondo de la cámara, que está conectado con un tubo de borboteo circular 28; este último introduce aire a baja presión por la parte

10

15

20

25

30

14.11.69

- 6 -

373678



19 NO

inferior de la mezcla de cultivo de tal manera que el ai
 re se eleva a través de toda la altura de la misma. Una
 pluralidad de salidas de aire colocadas simétricamente ,
 una para cada tubo de conexión, están dispuestas en la -
 5 parte superior de la cámara, dos de las cuales se muestran
 en 29 y 30, para dar salida al aire de las mismas. Cada -
 una de tales salidas está dispuesta sensiblemente encima
 de un extremo de descarga de aire. En 31 se muestra un tu
 bo de entrada de nutriente para la cámara, provisto de -
 10 válvula, situado adyacente al fondo de la cámara, y un -
 tubo 32 de salida de fermento, provisto asimismo de vál-
 vula, está dispuesto contiguo a la parte superior de la
 cámara.

Dentro de la cámara ll están dispuestos
 de manera fija dos tabiques anulares separados 33 y 34,
 15 concéntricos, los cuales forman lo que puede llamarse una
 zona de agitación 35. Los tabiques están separados tanto
 de la parte superior como del fondo de la cámara, tal co
 mo puede verse. El tabique más interior, 34, está provis-
 to de aberturas a través de las cuales pasan los extremos
 20 de descarga de aire 22-27. El tubo borboteador circular
 28 está dispuesto en el fondo de la zona 35. A medida que
 el aire asciende en dicha zona, agita la mezcla de culti-
 vo 36 y suministra al mismo tiempo oxígeno a la misma. El
 aire sale al exterior por las aberturas, 29,30, etc. La
 25 mezcla de cultivo agitada rebosa por encima de los tabi-
 ques 33 y 34, como se indica mediante las flechas 37 y
 38; por el fondo de la zona 35 entra un nuevo aporte de
 mezcla, la cual es transportada hacia arriba, por así de
 cirlo, por el aire ascendente; de este modo se establece
 30 una circulación, ascendiendo la mezcla por el interior de

373678

14.11.69



la zona 35 y descendiendo por los lados exteriores de los tabiques 33 y 34. Hablando estrictamente, las burbujas ascendentes de aire en la zona 35 tienden a reducir la densidad de la mezcla en la zona, al mismo tiempo que penetra
5 mezcla del exterior de la zona por la parte inferior de ésta para igualar la densidad. Se crea lo que se denomina un efecto de chimenea.

Si bien las ventajas de la invención pueden obtenerse con una sólo cámara de fermentación, como se ha descrito, son posibles economías más favorables con
10 una pluralidad de tales cámaras espaciadas a lo largo del conducto 10, unas sobre otras, llevando cada una de ellas asociados consigo los tubos de conexión, borboteador, salidas de aire y tubos de entrada de nutriente y salida de
15 fermento descritos. Una segunda cámara se indica en 40, y debe entenderse que el número es variable, pudiendo ser de 3,4,5, ó más. En la disposición que se muestra en la Fig. 1, el aire a baja presión puede pasar desde el conducto a cada una de las cámaras prácticamente al mismo tiempo
20 , permitiendo así un funcionamiento de las cámaras en paralelo.

Es también posible el funcionamiento en serie, representado en la Fig. 3, en la cual se muestra esencialmente el mismo aparato de la Fig. 1 excepto en lo
25 referente a las siguientes adiciones. En el conducto 10 se dispone una válvula 45, accionada adecuadamente por medios no representados. Las salidas de aire 46 y 47 están provistas ambas de válvulas, y un tubo de retorno provisto de
30 válvula, 48, 49, conecta cada una de las salidas de aire con el conducto 10 en un punto situado justamente por en

cima de la válvula 45. En esta disposición, la válvula 45 se mantiene cerrada, de tal manera que el aire, después - de pasar a través de la cámara de fermentación 50, pasa a la cámara inmediata, no representada en la Fig. 3, pasando por las salidas 46 y 47, y por los tubos 48 y 49.

Pueden mencionarse algunas característi- cas. del aparato descrito. Como se ha indicado, la forma a nular de la cámara 11, y la disposición radial de los tu- bos de aire 13-18 , forman una disposición simétrica con respecto al conducto 10 de suministro de aire central, y en virtud de esta disposición se consiguen distancias mí- nimas y prácticamente iguales de recorrido del aire, junto con pérdidas mínimas de presión. La pérdida de presión en el conducto 10 se mantiene también en un nivel mínimo ha- ciéndolo de gran diámetro; por ejemplo, un diámetro útil está comprendido entre 15 y 40 cm., aunque pueden ser a- decuados también diámetros mayores y menores. En la opera- c i ó n en paralelo, una cámara de fermentación puede aislar se de las restantes cámaras, p. ej., para mantenimiento o en caso de contaminación, cerrando simplemente las válvulas de los tubos 13-18. Debido a la muy baja presión de aire, la construcción de la cámara y de los tubos últimamente mencionados no necesitan ser de material o diseño de alta resistencia, pudiéndose conseguir así economías en la fa- bricación.

El enfriamiento de una cámara de fermen- tación, cuando se requiere, puede hacerse por medio de la corriente de aire a baja presión utilizada para agitación y suministro de oxígeno. Para este propósito, el aire, an- tes de entrar en la cámara. se seca en el grado deseado a



tendrán un BHL (Balance Hidrófilo-Lipófilo) comprendido aproximadamente entre 3 y 6. (Los valores numéricos BHL se explican en una publicación de Atlas Chemical Co. titulada "Atlas Surfactants", donde se indica que varían entre 1 y 30 aproximadamente, indicando los valores más bajos - un material más lipófilo y los valores más altos un material más hidrófilo). Pueden obtenerse también agentes de valor BHL adecuado por mezcla de dos o más de otros agentes. Los agentes útiles se utilizan en cantidades convencionales, y preferiblemente son comestibles o no-tóxicos y no-biodegradables.

La emulsión puede formarse convenientemente en el interior de la cámara de fermentación, aunque es también factible prepararla por medio de un homogenizador convencional y añadirla luego a la cámara.

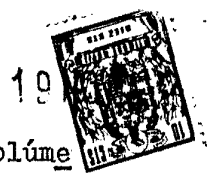
Se prefieren emulsiones del tipo agua en aceite porque el oxígeno es considerablemente más soluble en la fase hidrocarbonada que en la fase acuosa, y dado que la fase hidrocarbonada es la fase continua, la ventaja es evidente en el sentido de una mayor velocidad de transferencia de oxígeno de la fase hidrocarbonada a la fase acuosa en la que tienden a concentrarse las células. No obstante, la invención puede llevarse a la práctica también con emulsiones del tipo de aceite en agua, y éstas pueden formarse empleando cantidades de hidrocarburos menores que las descritas inmediatamente arriba para las emulsiones de agua en aceite, en cuyo caso la emulsión se forma y se mantiene por la agitación producida por la corriente de aire; también se pueden formar emulsiones de aceite en agua de composición más variable en presencia



de un agente emulsificante que promueva emulsiones de a
ceite en agua. Como se muestra en los ejemplos, son posi-
bles emulsiones de aceite en agua que tienen 1,5 y 66,7%
de hidrocarburos.

5 Cualquiera que sea el tipo de emulsión ,
se prefiere que la mezcla de cultivo tenga un alto conte-
nido de hidrocarburos por la razón de que el consumo de -
energía parece ser menor que en el caso en que el conteni-
do de hidrocarburos es bajo. Preferiblemente, los hidro-
10 carburos representarán como mínimo el 50 ó 60%, o más ,ex-
presado en volumen.

Considerando la operación del método con
más detalle, particularmente en relación con el aparato
descrito, la cámara 11 puede cargarse por la tubería 31 -
15 con el nutriente mineral acuoso y el hidrocarburo, añadi-
dos por separado o juntamente. Se añade suficiente mate-
rial para llenar la cámara hasta el nivel indicado en 21.
Está también presente un microorganismo, que se añade al
material antes o después de cargar el mismo. La mezcla de
20 cultivo resultante se lleva a temperatura y se hace pasar
a través de la misma aire a baja presión procedente del
tubo borboteador 28 a una velocidad deseada, siendo éste
al menos suficiente para hacer que la mezcla se mueva ha-
cia arriba en la zona de agitación 35 y rebose por encima
25 de los tabiques 33 y 34. Se crea así un flujo, ascendien-
do el líquido, por así decirlo, en la zona 35 y descen-
diendo por gravedad a lo largo de los tabiques 33 y 34.
La velocidad de este flujo puede estimarse visualmente,
para cuyo propósito están dispuestas mirillas de vidrio,
30 no representadas, y controlarse ajustando el caudal de -



aire. Un caudal típico de aire es aproximadamente 7 volúmenes de aire por volumen de cuba de fermentación y por minuto, aunque puede variar desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 volúmenes de aire por volumen de cuba de fermentación y por minuto.

Aire a baja presión en el intervalo deseado puede obtenerse por medio de una válvula reguladora de presión adecuadamente pre-ajustada en la tubería comprendida entre la bomba de aire y la cuba de fermentación. O bien puede obtenerse regulando la altura de la zona de agitación 35; en otros términos, la altura de la mezcla de cultivo en la zona 35 debiera ser tal que la presión de aire seleccionada (dentro de los intervalos dichos anteriormente) sea justamente eficaz para hacer que la mezcla circule hacia arriba a través de la zona.

La mezcla de cultivo contenida en la cámara puede calentarse insertando en la misma un dispositivo calentado eléctricamente, o empleando una camisa de calentamiento, o bien utilizando una corriente de aire caliente, o por cualquier otro procedimiento adecuado. Pueden utilizarse medios automáticos para el control de la temperatura, de tipo convencional, a fin de mantener una temperatura constante en el campo de 20 a 55°C, preferiblemente de 30 a 40°C. El pH puede controlarse en el campo de 3 a 8,5, preferiblemente de 3,5 a 7, mediante un instrumento adecuado, no representado, y si es necesario se harán ajustes de vez en cuando, añadiendo un material alcalino o ácido.

Como se ha descrito, la operación puede ser del tipo por cargas o continua. En el primero de los

14.11.69

373678



184
t ipos, la carga inicial de mezcla de cultivo se mantiene a todo lo largo de la operación, sin efectuarse adición alguna y, con la excepción de muestras para ensayo, sin hacer tampoco extracciones. En el último tipo, se hacen a
5 diciones y extracciones, de manera continua o intermitente, a lo largo del transcurso de una operación.

En una operación por cargas, la cámara
11 puede cargarse por la tubería 32 ó 31, ó incluso por las tuberías 29,30, etc., y vaciarse por la tubería 31. La
10 operación se interrumpe usualmente cuando ya no se observa un aumento ulterior de la reproducción celular, y esto último puede comprobarse retirando muestras de la mezcla para ensayo de vez en cuando y analizando las mismas, p. -
15 ej., por medio de medidas de la densidad óptica, o por pruebas en un momento dado tales como medida gravimétricas del peso de células. Cuando se decide interrumpir la fermentación, se cortan el paso de aire y el aporte de calor, y la mezcla se vacía del sistema a un recipiente de sedimentación en el que se produce la separación de las fases
20 dejando que la mezcla permanezca en reposo, aunque pueden emplearse otros medios de separación. La fase de aceite asciende a la parte superior del recipiente de sedimentación, se separa, y se deja para volver a utilizarla en otra operación. La fase acuosa, en la que se han concentrado las células, se somete a una etapa de separación adecuada, tal como filtración, centrifugación, decantación, floculación, etc., por la cual se recuperan las células. El nutriente mineral acuoso utilizado resultante puede, si se desea, tratarse para recuperar cualesquiera cantidades de productos químicos, y si esto no es factible o
25
30

19 NOV. 19



si no se desea, puede desecharse, o bien, si está justifi-
c ado, volverse a utilizar.

Se pueden obtener rendimientos en células
de hasta 20 g por litro de mezcla de cultivo, ó más.

5 En una operación continua, son aplicables
los procedimientos utilizados en una operación por cargas,
excepto que a lo largo del transcurso de la operación se -
efectúan adiciones de hidrocarburo y de nutriente mineral
acuoso, y extracciones de mezcla de cultivo, bien sea de
10 manera intermitente o continua. Estas adiciones y extrac-
ciones están equilibradas, no sólo para mantener la canti-
dad o nivel de mezcla de cultivo en la cámara, sino tam-
bién para mantener las condiciones de la emulsión, esto -
es, para mantenerla en cuanto a tipo y composición. La mez-
15 cla de cultivo extraída puede separarse en fases de manera
continua o intermitente, volviéndose a utilizar la fase -
de aceite, p. ej., por recirculación separándose y recupe-
rándose las células de la fase acuosa. La fase acuosa uti-
lizada puede volver a utilizarse como tal, o puede recons-
20 tituirse primeramente por adición de sales minerales y -
reutilizarse después; o bien, si se considera que su con-
dición es inadecuada, puede purificarse eliminando las sus-
tancias tóxicas, o se puede despreciar. Si se desea, pue-
den recircularse algunas de las células producidas, antes
25 o después de la separación de la fase acuosa, dado que tal
recirculación puede producir un cierto estímulo para nue-
vas reproducciones. Las extracciones y adiciones pueden
iniciarse en cualquier momento deseado, bien sea en el -
momento de máxima reproducción o concentración de las cé-
30 lulas, o en algún momento anterior. El momento de máxima

14.11.69

373678



reproducción puede establecerse representando un gráfico de varianza entre concentración de células y tiempo de operación. Una ventaja de una operación continua estriba en que proporciona una producción continua de células; otra ventaja estriba en que se pueden eliminar continuamente los productos tóxicos que tienden a concentrarse en la fase acuosa. Y como puede verse evidentemente, el aparato de las Figs. 1-3 se presta bien por sí mismo a la operación continua.

10 En una operación continua, pueden obtenerse productividades de células de hasta aproximadamente 2 g por litro de mezcla de cultivo por hora.

15 Como se ha descrito, cualquier microorganismo aerobio que utilice hidrocarburos es adecuado para uso en la invención, incluyendo bacterias, hongos, levaduras y mohos.

20 De las bacterias, los géneros adecuados - incluyen Pseudomonas, Bacillus, Flavobacterium, Sarcina, etc. Especies ilustrativas de estos géneros son P. aeruginosa, P. oleovorans, P. putida, P. boreopolis, P. methanica, P. fluorescens, P. pyocyanea; B. aureus, B. acidi, B. subtilis, B. urici, B. cereus, B. coagulans, B. mycoides, B. circulans, B. megaterium; Flavobacterium aquatile; Sarcina alba, Sarcina luteum.

25 Otros géneros preferidos son Achromobacter y Nocardia, ilustrados por especies tales como A. xerosis, A. agile, A. guttatus, A. superficialis, A. parvulus, A. cycloclastes; N. salmonicolor, N. asteroides, N. minimus, N. opaca, N. corallina, N. rubra, y N. paraffinae. Es útil el género Mycobacterium, particularmente especies ta

30



le s como M. parafficum, M. phlei, M. lacticola, M. rhodochro us, M. smegmatis, M. rubrum, M. luteum, M. album, y M. byalinicum.

5 Todavía otras bacterias que utilizan hidrocarburos son Methanomonas methanica y Methanomonas sp.; Micrococcus paraffinae; B. aliphaticum, B. hidium, y B. benzoli, pertenecientes al género Bacterium; y especies - de Micromonospora. Otros géneros útiles incluyen Brevibacterium, Aerobacter, y Corynebacterium.

10 De los hongos, el método es aplicable a cualquier hongo perteneciente a la clasificación Eumicetos u hongos verdaderos, pero preferiblemente a los de la clase Fungi Imperfecti o a los de la clase Ficomicetos. Los

15 hongos preferidos de la clase Fungi Imperfecti son especies de los géneros Aspergillus y Penicillium, ilustrados por A. niger, A. glaucus, A. oryzae, A. flavus, A. terreus, A. itaonicus; P. notatum, P. Chrysogenum, P. glaucum, P. griseofulvum, P. expansum, P. digitatum, P. italicum, etc. Otros roganismos adecuados incluyen diversas -
20 especies de los géneros Monilia, Helminthosporium, Alternaria, Fusarium, y Myrothecium. Hongos preferidos de la clase Ficomicetos incluyen especies de los géneros Rhizopus y Mucor, tales como R. nigricans, R. oryzea, R. delemar, R. arrhizus, R. stolonifer, R. sp.; M. mucedo,
25 M. genevensis.

Algunos de los géneros precedentes de hongos se caracterizan también como mohos, tales como Aspergillus, Penicilium, Rhizopus, y Mucor, pero se entenderá que todos ellos son hongos verdaderos o Eumicetos.

30 De las levaduras, los organismos preferidos

son los de la familia Cryptococcaceae, y particularmente los de la subfamilia Cryptococcoidae. Son géneros preferidos Torulopsis (o Torula) y Candida. Son especies preferidas Candida lipolytica, Candida pulcherrima, Candida utilis, Candida utilis Variati major, Candida tropicalis, Candida intermedia, y Torulopsis colliculosa. Otras especies útiles son Hansenula anomala -- Oidium Lactia, y Neurospora sitophila.

El hidrocarburo es uno tal que se encuentra en fase líquida a la temperatura de incubación, por lo que será capaz de formar una emulsión de agua en aceite. Se prefieren hidrocarburos alifáticos, los cuales pueden ser hidrocarburos saturados o insaturados, de cadena recta o ramificada, que tengan hasta 20, 30, 40 ó más átomos de carbono. Son particularmente deseables los hidrocarburos saturados de cadena recta que tienen hasta 20 carbonos. Pueden utilizarse también hidrocarburos cíclicos, comprendiendo compuestos aromáticos y alifáticos, incluyendo compuestos cíclicos alcohol-sustituídos que tienen 1, 2, ó más alcohol-sustituyentes, cada uno de los cuales puede tener cualquier longitud, -- configuración de cadena, y grado de saturación adecuados, y en los cuales el resto cíclico es aromático o cicloparafínico. Los hidrocarburos aromáticos alcohol-sustituídos incluyen tolueno, los diversos xilenos, mesitileno, etilbenceno, p-cyameno, los dietilbencenos, y los propilbencenos, butilbenceno, amilbencenos, heptilbencenos, y octilbencenos isómeros. Entre las cicloparafinas alcohol-sustituídas útiles se encuentran metilciclopentano,

373678



los di- y tri-metilciclopentanos, etilciclopentano, los dietilciclopentanos, los diversos propil-, butil-, amil-, hexil-, y octil-ciclopentanos. Asimismo, son útiles los alcohol-ciclohexanos, los cuales están sustituidos de modo semejante a los alcoholciclopentanos, y que incluyen además compuestos tales como los diversos tetrametilciclohexanos, metiletilciclohexanos, metilpropilciclohexanos, etcétera.

Se utilizan petróleos crudos, así como diversas fracciones de petróleo, residuos, etc.

Se apreciará que el hidrocarburo puede encontrarse en la fase líquida, no sólo por tener un punto de fusión adecuado, sino también por encontrarse disuelto en un disolvente adecuado. Los hidrocarburos considerados en los párrafos que anteceden son aquéllos que son normalmente líquidos a la temperatura de incubación. No obstante, otros hidrocarburos útiles son aquéllos que son normalmente gaseosos a la temperatura de incubación, tales como metano, etano, propano, butano, y otros hidrocarburos C₃ a C₅. Estos hidrocarburos gaseosos pueden disolverse en un hidrocarburo normalmente líquido, tal como una fracción de petróleo perteneciente al intervalo de ebullición de la gasolina o del keroseno, o en un alcano tal como octano, nonano, decano, etc.; o bien se pueden disolver en cualquier otro disolvente convencional de los mismos que sea inerte en el procedimiento y no tóxico para las células. Asimismo, se pueden utilizar hidrocarburos normalmente sólidos como fuente de carbono disolviéndolos en un disolvente hidrocarburado, de la ma-



nera descrita, o en cualquier otro disolvente convencional inerte y no-tóxico.

El nutriente salino mineral acuoso comprende una fuente de nitrógeno tal como un nitrato o nitrito, una sal de amonio o urea, e iones tales como potasio, magnesio, fosfato, y sulfato, así como iones de elementos traza como molibdeno, cobalto, etc. Pueden estar presentes trazas de manganeso, hierro, y calcio. Dado que se incluye agua en el nutriente, la mayoría de estos iones estarán presentes usualmente en cantidad suficiente en los suministros ordinarios de agua potable. No obstante, es deseable añadir los iones al nutriente para garantizar su presencia en cantidad suficiente para el cultivo. Usualmente, el nutriente está constituido fundamentalmente por agua, la cual puede constituir 99% en peso, o más, del nutriente, aunque puede constituir también una proporción menor, que puede limitarse hasta el 50% del mismo. Generalmente puede utilizarse cualquier proporción de agua que esté comprendida dentro de las cantidades empleadas hasta ahora en los cultivos de microbios. Un nutriente de sales minerales adecuadas puede estar constituido como sigue, estando disueltos los componentes en suficiente cantidad de agua para formar un litro de solución:

TABLA 1

Monohidrogenofosfato potásico	6,0 g
Dihidrogenofosfato sódico	9,0
Molibdato sódico	0,006
Cloruro cobáltico	0,006



Sulfato magnésico	0,6
Sulfato amónico	6,0

Otro nutriente adecuado de sales minerales -
es como sigue:

5

TABLA 2

Monohidrogenofosfato sódico	9 g/lit.
Dihidrogenofosfato potásico	6
Sulfato amónico	6
Sulfato magnésico	0,6
10 Carbonato sódico	0,3
Cloruro cálcico	0,03
Sulfato ferroso	0,015
Sulfato de manganeso	0,006
Cloruro de cobalto	0,006
15 Molibdato sódico	0,006

La invención puede ilustrarse por los ejemplos siguientes.

EJEMPLO 1

20 Se preparó una mezcla que comprendía 1,5% de n-hexadecano y 98,5% de nutriente mineral acuoso de la composición indicada arriba en la Tabla 1, referida a volúmenes, y después de inocular la mezcla con Brevibacterium sp., la mezcla de cultivo resultante, que formaba una emulsión de aceite en agua, se cultivó a una temperatura de 35°C en un dispositivo de 10 litros con elevación por aire similar al descrito en la solicitud de patente, asimismo pendiente. Caso 7134, Gorring, Núm. de Serie - 25 757.286, presentada en 4 de septiembre de 1968. Se utilizó aire a una presión de 5 cm de mercurio (manométrica) para suministro de oxígeno y como único medio de agita-- 30



19

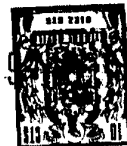
5 ción. Se prolongó el crecimiento por reproducción de -
las células hasta que se alcanzó una densidad de célu-
las secas de 10,0 g/l, durante cuyo tiempo la velocidad
de reproducción alcanzó un valor de 1,2 gramos(litro-
hora. La energía total consumida ascendió a 0,595 kwh
por kilogramo de producto de células secas. En una ope-
ración comparable, excepto que la agitación se llevó a -
cabo por medio de un agitador mecánico y que no se hi-
zo borbotear nada de aire a través de la mezcla de cul-
10 tivo, la densidad máxima de células secas fué de 10 g/l,
la velocidad de reproducción alcanzó un nivel de sólo -
1,0 gramos/litro-hora, y la energía total consumida -
fué de 1,32 kwh por kilogramo de producto de células se-
cas.

15

EJEMPLO 2

Se preparó una mezcla que contenía 66,7% de
n-hexadecano y 33,3% de nutriente mineral acuoso, inocu-
lándola con *Brevibacterium* sp. El nutriente mineral te-
nía la composición identificada arriba en la Tabla 2. La
mezcla de cultivo resultante formaba una emulsión de -
aceite en agua. Se fermentó en el aparato descrito en -
el Ejemplo 1, excepto que éste era de 4 litros de capa-
20 cidad, utilizando aire a una presión de 3,25 cm de mer-
curio (manométricos) como fuente de oxígeno y como único
medio de agitación. La temperatura fué de 35°C. Se conti-
25 nuó el cultivo hasta que se alcanzó una densidad de cé-
lulas secas de 10 g/l, alcanzando la velocidad de repro-
ducción un nivel de 1 gramo/litro-hora. La energía total
consumida fué solamente de 0,088 kwh por kilogramo de -
30 producto de células secas.

373678




Del Ejemplo 1 se deduce evidentemente que el consumo total de energía es sólo $1/3$ del de una operación similar pero en la cual se utiliza agitación mecánica. El Ejemplo 2 demuestra el bajo nivel de consumo total de energía que puede alcanzarse; e ilustra también, por comparación con el Ejemplo 1, que una mezcla de cultivo con alto contenido de aceite consume considerablemente menos energía que una mezcla de cultivo con bajo contenido de aceite.

EJEMPLO 3

Se preparó una mezcla que contenía 66,6% de n-hexadecano y 33,3% de nutriente mineral acuoso, y se inoculó con Brevibacterium sp. El nutriente mineral tenía la composición identificada arriba en la Tabla 2. Se añadió un agente emulsificante (polietoxi nonil fenol) en una cantidad de 1,1% en volumen, y la mezcla de cultivo resultante formó una emulsión de agua en aceite. Se fermentó en el aparato descrito en el Ejemplo 2, utilizando aire a una presión de 3,75 cm de mercurio (manométricos) como fuente de oxígeno y como único medio de agitación. La temperatura fué de 35°C. El caudal de aire fué de 14,1 litros/minuto. Se continuó el cultivo hasta que se alcanzó una densidad de células secas de 13 g/l. A un caudal de mezcla de cultivo de 0,60 litros/hora, la energía total consumida fué sólo de 0,154 kwh por kilogramo de producto de células secas.

Puede observarse que en el caso de que el objetivo sea cultivar microorganismos para propósitos no alimenticios, puede utilizarse la invención para cultivar

10-1-69 22



microorganismos patógenos.

Se entenderá que la invención es susceptible de variaciones evidentes sin desviarse de su objeto.

5 La presente solicitud que corresponde a la -
presentada en Estados Unidos de América, con fecha 26
de Diciembre de 1.968, bajo el número 786.953, se acoge
a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto
sobre Propiedad Industrial.

10

- REIVINDICACIONES -

15

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:

20

1.- Un método para cultivar un microorganismo aerobio que comprende incubar dicho microorganismo en una mezcla constituida por una solución acuosa de una sal mineral y una fuente de carbono para energía y crecimiento, para formar así una mezcla de cultivo, hacer pasar un gas que contiene oxígeno al interior y a través de dicha mezcla de cultivo para suministrar oxígeno para dicho microorganismo y para servir como medio para agitar la mezcla de cultivo, cultivar las células de dicho mi-

25

30

42-11-69

373678



croorganismo a lo largo de un período de tiempo, y mantener la presión de dicho gas que entra en la mezcla de cultivo en un valor bajo comprendido en el intervalo -- aproximado de 0,64 a 15 cm de mercurio (manométricos) - durante dicho período de tiempo.

5

2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo es un microorganismo que utiliza un hidrocarburo y dicha fuente de carbono es un hidrocarburo.

10

3.- El método de la reivindicación 2, en el que dicho aire a baja presión es el único medio de agitación.

15

4.- El método de la reivindicación 3, en el que se obtiene un crecimiento microbiano al menos igual al obtenido en un procedimiento similar pero con un consumo de energía esencialmente menor por kilogramo de producto de células, utilizando dicho procedimiento similar agitadores mecánicos o aire a alta presión para agitar la mezcla de cultivo.

20

5.- El método de la reivindicación 3, en el que se obtiene un crecimiento microbiano al menos igual al de un procedimiento similar pero con un consumo de energía esencialmente menor por kilogramo de producto -- de células, de sólo aproximadamente 1/15 a 1/2 del mismo, utilizando dicho procedimiento similar agitadores mecánicos o aire a alta presión para agitar la mezcla de cultivo.

25

6.- El método de la reivindicación 3, en el que se cultivan dichas células hasta que se nivela la veloci-

30

12-11-69



19

dad de reproducción de las mismas, recogién dose a con-
tinuación dichas células.

7.- El método de la reivindicación 3, en el -
que dicha mezcla de cultivo forma una emulsión.

5

8.- El método de la reivindicación 7, en el
que dicha emulsión se forma y se mantiene gracias a la
agitación producida por dicho gas.

9.- El método de la reivindicación 7, en el
que dicha emulsión es una emulsión de aceite en agua.

10

10.- El método de la reivindicación 9, en el
que dicha emulsión de aceite en agua tiene un alto con-
tenido de hidrocarburo, de 40% ó superior, referido al
volumen de la emulsión.

11.- El método de la reivindicación 9, en el
que dicha emulsión de aceite en agua tiene un bajo con-
tenido de hidrocarburo, de 5% ó inferior, referido al -
volumen de la emulsión.

15

12.- El método de la reivindicación 7, en el
que dicha emulsión es una emulsión de agua en aceite.

20

13.- El método de la reivindicación 1, en el
que dicho gas es aire.

14.- El método de la reivindicación 1, que -
comprende disponer dicha mezcla de cultivo en forma anu-
lar, disponiéndola alrededor de una fuente central de -
dicho gas a baja presión, y hacer pasar dicho gas proce-
dente de dicha fuente, a través de una pluralidad de con-
ducciones espaciadas en el sentido de la circunferencia -
y que se extienden radialmente hasta dicha mezcla de --
cultivo.

25

15.- El método de la reivindicación 14, en el

30

12-11-69



que dicha mezcla de cultivo se hace circular continuamente en un sentido esencialmente de ascenso y descenso por medio de dicho gas.

5 16.- El método de la reivindicación 14, que comprende formar una pluralidad de dichas mezclas de cultivo y disponerlas de manera superpuesta, unas sobre otras pero separadas, y hacer pasar dicho gas procedente de dicha fuente, radialmente hacia el exterior a través de todas y cada una de las mezclas de cultivo.

10 17.- Un método para cultivar un microorganismo aerobio que comprende incubar dicho microorganismo, que utiliza hidrocarburo, en una mezcla constituida por una solución acuosa de una sal mineral y un hidrocarburo como fuente única de carbono para energía y crecimiento,
15 para formar así una mezcla de cultivo, hacer pasar un gas que contiene oxígeno al interior y a través de dicha mezcla de cultivo para suministrar oxígeno para dicho microorganismo y para evitar como único medio de agitación de la mezcla de cultivo, cultivar las células de dicho microorganismo a lo largo de un período de tiempo, mantener
20 la presión de dicho gas que entra en la mezcla de cultivo en un valor bajo comprendido en el intervalo de 1,25 a 5 cm de mercurio (manométricos) a lo largo de dicho período, y obtener un crecimiento microbiano al menos igual al
25 obtenido en un procedimiento similar pero con un consumo de energía, por kilogramo de producto de células, de sólo aproximadamente 1/15 a 1/3 del mismo, utilizando dicho procedimiento similar solamente agitadores mecánicos o aire a alta presión para agitar la mezcla de cultivo.

373678



23 FEB. 1972

18.- Un método para cultivar un microorganism-
mo aerobio.

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

Esta Memoria consta de ventiocho hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

23 FEB. 1972

Madrid,

P.A.

Alonso de Lizasoain
For Power

11-2-72

FBG.

- 28 - 373678

FIG. 1

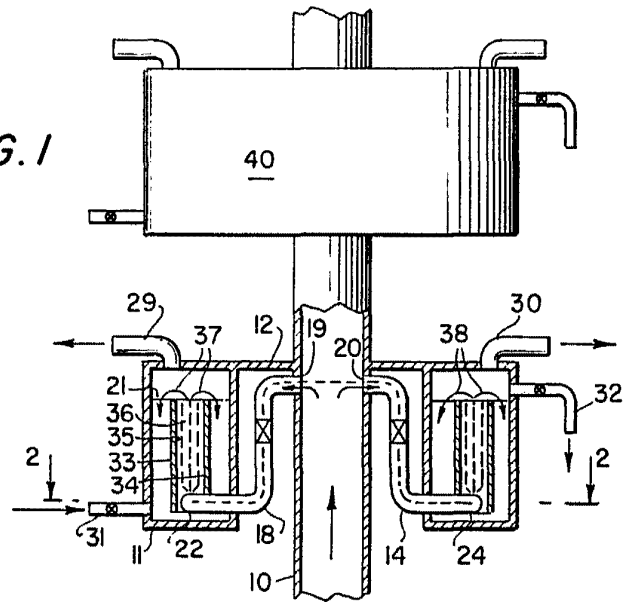


FIG. 2

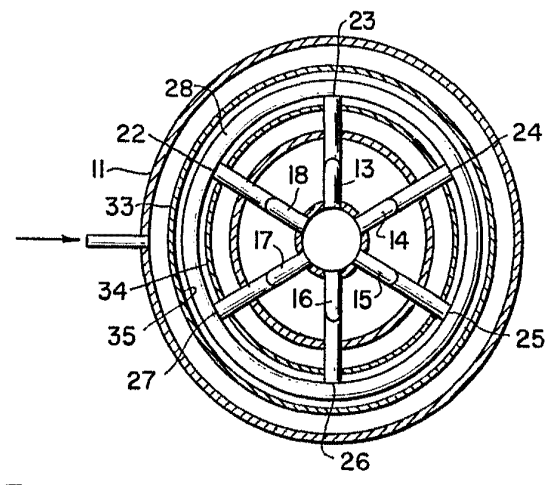
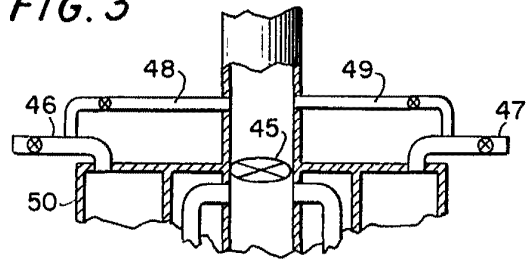


FIG. 3



69277