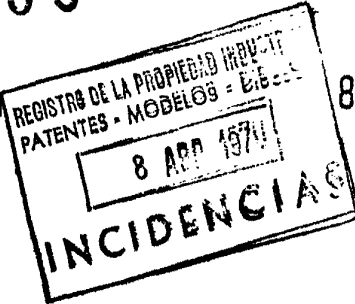


SE	CLAS	CLAS
C.	ACK	C.
CLAS	C-12	
SUBCLAS	B	

P - 44.107
F-7134

377035

Memoria descriptiva



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 DE CULTIVAR UN MICROORGANISMO QUE
UTILIZA HIDROCARBUROS" (Clase Internacional
C12b)



Esta invención se refiere a un método para desarrollar microorganismos y para obtener proteínas y otros materiales útiles por síntesis microbiológica.

5 Muchos microorganismos son capaces de producir proteínas y otros materiales útiles a partir de hidrocarburos. Estas proteínas pueden emplearse como alimento para el ganado y otros animales incluyendo los seres humanos. Hasta ahora, las mezclas de cultivo empleadas para cultivar los microorganismos han sido emulsiones de aceite en agua, formando la fase discontinua el hidrocarburo que se utiliza como fuente de carbono.

10 Se ha descubierto ahora en la invención que es deseable utilizar una emulsión de agua en aceite como medio de cultivo. La ventaja es que el oxígeno puede ser transferido a la fase acuosa (en la que tiene lugar realmente el desarrollo celular) mucho mejor que con las emulsiones convencionales de agua en aceite. El resultado es que se consigue una velocidad mayor de desarrollo celular.

15 Por tanto, según la presente invención se proporciona un método para cultivar el desarrollo de microorganismos que utilizan hidrocarburos, que comprende incubar el microorganismo en una mezcla de cultivo en forma de una emulsión de agua en aceite, comprendiendo la fase de aceite un hidrocarburo como única fuente de carbono para las necesidades energéticas y de desarrollo, y comprendiendo la fase acuosa una disolución nutritiva acuosa de sal mineral. Las células se cultivan en la mezcla de cultivo introduciendo en la misma un gas que contiene oxígeno, y, una vez que ha tenido lugar el grado deseado de desarrollo celular, la mezcla puede ser dividida en una fase de aceite y una fase acuosa.

377035



sa que contiene la mayoría de las células, y las células pueden ser recuperadas a partir de la fase acuosa.

La invención es aplicable a cualquier especie microbiana aerobia que pueda utilizar un hidrocarburo como fuente de carbono para las necesidades energéticas y de desarrollo. Pueden emplearse bacterias, hongos, levaduras y mohos.

Se prefieren los organismos no delicados o complicados, es decir los que se desarrollan en medios simples de sales, sin necesidad de la adición de compuestos orgánicos. Se excluyen las especies que son patógenas activas para los animales o seres humanos.

De las bacterias, los géneros adecuados incluyen las *Seudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Sarcina*, etc. Son especies ilustrativas de estos géneros el *P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. putida*, *P. boreopolis*, *P. methanica*, *P. fluorescens*, *P. pyocyanea*; *B. sureus*, *B. acidi*, *B. subtilis*, *B. urici*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, *B. circulans*, *B. megaterium*; *Flavobacterium aquatile*; *Sarcina alba*, *Sarcina luteum*.

Otros géneros preferidos son el *Achromobacter* y *Nocardia*, ilustrados por especies tales como el *A. xerosis*, *A. agile*, *A. gutatus*, *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 las especies tales como el *M. parafficum*, *M. phlei*, *M. lacticola*, *M. rhodochrous*, *M. smegmatis*, *M. rubrum*, *M. luteum*, *M. album*, *M. byalinicum* y *M. leprae*.

Otras bacterias que utilizan hidrocarburos son el

377035



Methanomonas methanica y Methanomonas sp.; el Micrococcus
paraffinae; B. aliphaticum, B. hidium y B. benzoli, del gé-
nero Bacterium; y las especies de Micromonospora. Otros gé-
neros útiles incluyen los Brevibacterium, Aerobacter y Co-
rynebacterium.

5

De los hongos, el método es aplicable a cualquier
hongo comprendido en la clasificación de Eumicetos u hon-
gos verdaderos, pero preferiblemente a los de la clase de
hongos imperfectos o de la clase Phycomycetos. Los hongos
preferidos de la clase de Fungi Imperfecti son las especies
de los géneros Aspergillus y Penicillium, ilustrados por
el A. niger, A. glaucus, A. oryzae, A. flavus, A. terreus,
A. itaconicus; P. notatum, P. chrysogenum, P. glaucum, P.
griseofulvum, P. expansum, P. digitatum, P. italicum, etc.

10

Otros organismos adecuados incluyen varias especies de los
géneros Monilia, Helminthosporium, Alternaria, Fusarium y
Myrothecium. Los hongos preferidos de la clase de Phycomyce-
tes incluyen especies de los géneros Rhizopus y Mucor, ta-
les como el R. nigricans, R. oryzea, R. delemar, R. arrhi-
zus, R. stolonifer, R. sp.; M. mucedo, M. genevensis.

15

20

Algunos de los anteriores géneros de hongos están
también caracterizados como mohos, tales como los Aspergi-
llus, Penicillium, Rhizopus y Mucor, pero ha de entenderse
que todos son verdaderos hongos, o Eumycetes.

25

De las levaduras, los organismos preferidos son
de la familia Cryptococcaceae, y particularmente de la subfa-
milia Cryptococcoidae. Los géneros preferidos son los Toru-
lopsis (ó Torula) y Candida. Las especies preferidas son el
Candida lipolytica, Candida pulcherrima, Candida utilis,
Candida utilis variedad mayor, Candida tropicallis, Candida

30

377035



intermedia y Torulopsis colliculosa. Otras especies útiles son la Hansenula anomala, Oidium lactia y Neurospora sitophilila.

5 El hidrocarburo es tal que esté en fase líquida a la temperatura de incubación, para poder formar una emulsión de agua en aceite. Se prefieren los hidrocarburos alifáticos, y éstos pueden ser saturados o no saturados, de cadena recta o ramificada, y con hasta 20, 30, 40 o más átomos de carbono. Son particularmente deseables los hidrocarburos saturados de cadena recta que tienen hasta 20 átomos de carbono. También pueden emplearse hidrocarburos cíclicos, que comprenden compuestos aromáticos y alicíclicos, y que incluyen compuestos cíclicos sustituidos por alcohol que tienen 1, 2 ó más sustituyentes de alcohol, cada uno de ellos de cualquier longitud, configuración de cadena y grado de saturación apropiados, y en los que el resto cíclico es aromático o cicloparafínico. Los hidrocarburos aromáticos sustituidos por alcohol incluyen el tolueno, los varios xilenos, el mesitileno, etilbenceno, p-cimeno, los dietilbencenos, y los propilbencenos, butilbencenos, amilbencenos, heptilbencenos y octilbencenos isoméricos. Entre las parafinas sustituidas por alcohol útiles se encuentran el metilciclopentano, los di- y trimetilciclopentanos, el etilciclopentano, los dietilciclopentanos, y los varios propil-, butil-, amil-, hexil- y octilciclopentanos. También son útiles los alcoholciclohexanos, sustituidos de manera correspondiente a los alcoholciclopentanos anteriores, y que incluyen además los compuestos tales como los varios tetrametilciclohexanos, metiletilciclohexanos, metilpropilciclohexanos, y similares.

377035



Pueden utilizarse aceites o petróleos crudos, va
rias fracciones de petróleos, residuos, etc.

5 Ha de tenerse en cuenta que el hidrocarburo puede
estar en fase líquida no sólo por tener un punto de fusión
adecuado, sino también por estar disuelto en un disolvente
apropiado. Los hidrocarburos estudiados en los párrafos an
teriores son los normalmente líquidos a la temperatura de
incubación. No obstante, otros hidrocarburos útiles son los
normalmente gaseosos a la temperatura de incubación, tales
10 como el metano, etano, propano, butano, y otros hidrocarburo
ros de C_3 a C_5 . Estos hidrocarburos gaseosos pueden estar
disueltos en un hidrocarburo normalmente líquido, tal como
una fracción de petróleo en el intervalo de ebullición de
la gasolina o el queroseno, o en un alcano como el octano,
15 nonano, decano, etc; o pueden estar disueltos en cualquier
otro disolvente convencional de los mismos que es inerte en
el procedimiento y no es tóxico para las células. Asimismo,
pueden emplearse hidrocarburos normalmente sólidos como fuen
te de carbono, disolviéndolos en un disolvente hidrocarbona
do, de la manera descrita, o en cualquier otro disolvente
20 inerte convencional no tóxico.

El material nutriente de sal mineral acuosa com-
prende una fuente de nitrógeno tal como un nitrato o nitri
to, o sal de amonio o urea, e iones tales como el potasio,
25 magnesio, fosfato y sulfato, así como iones de oligoelemen
tos, como molibdeno, cobalto, etc. Puede haber presentes tra
zas de manganeso, hierro y calcio. Como en el medio nutrien
te se incluye agua, la mayoría de estos iones están usual
mente presentes en suficiente cantidad en las fuentes ordi
narias de agua potable. No obstante, es deseable añadir los
30

577035



iones al medio nutriente para asegurar su presencia en cantidad suficiente para el desarrollo. El medio nutriente consta usualmente de agua fundamentalmente, que puede constituir el 99%, o más, en peso del medio nutriente, aunque también puede constituir una proporción menor, llegando hasta el 50% del mismo. En general puede emplearse cualquier proporción de agua empleada hasta ahora en el desarrollo microbiano. Un medio nutriente adecuado de sales minerales puede tener los componentes siguientes, disolviéndose los componentes en suficiente agua para hacer un litro de disolución:

Tabla 1

	Monohidrogenofosfato potásico	6'0 g.
	Dihidrogenofosfato sódico	9'0 g.
	Molibdato de sodio	0'006
15	Cloruro cobáltico	0'006
	Sulfato de magnesio	0'6
	Sulfato de amonio	6'0

Otro material nutriente adecuado de sales minerales es como sigue:

Tabla 2

20	Monohidrogenofosfato sódico	9 g./ l.
	Dihidrogenofosfato potásico	6
	Sulfato de amonio	6
	Sulfato de magnesio	0'6
25	Carbonato de sodio	0'3
	Cloruro de calcio	0'03
	Sulfato ferroso	0'015
	Sulfato de manganeso	0'006
	Cloruro de cobalto	0'006
30	Molibdato de sodio	0'006

377035



El método comprende en líneas generales incubar el microorganismo en el medio nutriente mineral en presencia del hidrocarburo y oxígeno. Durante la incubación, la mezcla de cultivo es mantenida en condiciones que aseguran un desarrollo óptimo del microorganismo. La temperatura, por ejemplo, ha de mantenerse entre aproximadamente 20° y aproximadamente 55°C, y preferiblemente de 20° a 40°C. El pH se mantiene a un valor próximo a la neutralidad, es decir de aproximadamente 7'0, aunque puede variar entre aproximadamente 5'5 y 8'5. La mezcla se mantiene en un estado de agitación, por ejemplo por sacudidas, o empleando hélices, paletas, balancines, agitadores, u otros medios empleados ordinariamente para efectuar la agitación de una mezcla líquida. También se incluye la agitación producida haciendo circular aire en la mezcla después de introducirlo en la misma por medio de un tubo de burbujeo.

Las proporciones de la sustancia nutritiva mineral acuosa (que incluye agua y sales disueltas) son las necesarias para proporcionar la emulsión de agua en aceite, formando el hidrocarburo la fase continua. Preferiblemente, la emulsión es formada y mantenida por agitación de la mezcla de cultivo, y adecuadamente puede comprender al menos 66%, y hasta 80 ó 90% o más, de hidrocarburo, en volumen, siendo el resto el material nutriente mineral acuoso. Según este método preferido de formar la emulsión, hay presentes uno o más agentes emulsionantes, bien produciéndose en la mezcla de cultivo durante la fermentación, o siendo añadidos per se. Los agentes emulsionantes añadidos per se pueden ser de carácter iónico o no iónico, entendiéndose que han de ser adecuados para favorecer una emulsión de agua en aceite. Pue

377035



de formarse y mantenerse una emulsión del tipo de agua en
aceite con proporciones inferiores de hidrocarburo, desde
aproximadamente 66% hasta 35 ó 40%, siendo el resto mate-
5 rial nutritivo mineral acuoso, en volumen, y a estas propor-
ciones es preferible añadir uno o más agentes emulsionantes
per se, de la clase descrita. Algunos agentes ilustrativos
comprenden los oleatos y estearatos, como el sesquioleato
de sorbitan, monooleato de sorbitan, monoestearato de sorbi-
tan, oleato de glucósido de polioxietileno oxipropileno,
10 etc. Preferiblemente, los agentes tienen un HLB (Equilibrio
hidrófilo-lipófilo) de aproximadamente 3 a 6. (Los valores
numéricos de HLB se explican en una publicación de Atlas
Chemical Co, titulada "Atlas Surfactants", en la que se di-
ce que varían desde aproximadamente 1 a 30, indicando los
15 valores inferiores un material más lipófilo y los valores
superiores un material más hidrófilo). También pueden obte-
nerse agentes de valor de HLB adecuado mezclando dos o más
agentes distintos. Los agentes útiles se emplean en las pro-
porciones convencionales, y preferiblemente son comestibles
o no tóxicos.

La emulsión puede ser formada convenientemente en
el interior del fermentador, aunque es posible también pre-
pararla por medio de un homogenizador convencional, y aña-
dirla después al fermentador.

25 El fermentador puede estar abierto a la atmósfe-
ra, y, con la agitación de la mezcla, su superficie expues-
ta a la atmósfera es renovada continuamente y se absorbe
oxígeno de la atmósfera. No obstante, se prefiere mantener
cerrado el fermentador, y suministrar oxígeno haciendo bur-
30 bujear aire a través de la mezcla, proporcionando también

377035



con ello la agitación deseada.

En relación con el suministro de oxígeno al fermentador, del que depende la velocidad de desarrollo celular, la invención proporciona una notable ventaja con respecto a la producción de células convencional utilizando un medio de cultivo que comprende una emulsión del tipo de aceite en agua. En el método convencional, es transferido oxígeno desde las burbujas de aire, a través de la fase acuosa continua de la emulsión de aceite en agua, a las células en desarrollo dispuestas en dicha fase, y esta velocidad de transferencia depende de la solubilidad del oxígeno en la fase acuosa. A 37°C, una temperatura convencional de incubación, la solubilidad del oxígeno en la fase acuosa, en condiciones de equilibrio, es de aproximadamente 6 ppm. En el método de la presente invención, es transferido oxígeno desde las burbujas de aire, a través de la fase hidrocarbonada continua de la emulsión de agua en aceite, a una velocidad, bajo condiciones de equilibrio, correspondiente a su solubilidad en dicha fase, que está comprendida entre 60 y 100 ppm.; y desde la fase de hidrocarburo el oxígeno es transferido a las células en la fase acuosa dispersa. Se observará, por tanto, que la velocidad de transferencia a través de la fase continua de hidrocarburo es de 10 a 16 veces mayor que a través de la fase continua acuosa; y la velocidad de desarrollo celular en la emulsión de agua en aceite es mayor que en la emulsión de aceite en agua en un factor de al menos el mismo orden de magnitud.

Se muestra un método particularmente adecuado para desarrollar células en la emulsión de agua en aceite, suministrando al mismo tiempo aire en proporciones adecuadas

377035



no sólo para el desarrollo sino también para proporcionar la agitación, en el aparato representado esquemáticamente en las Figs. 1 y 2, siendo esta última una sección de la Fig. 1 por la línea 2-2. El método implica una operación con inyección de aire efectuada en un aparato 10 en forma de U, que comprende un par de columnas 11 y 12, cada una de ellas conectada en la parte inferior por una curva en U 13, y abierta cada una de ellas en la parte superior. Los extremos superiores abiertos, 14 y 15, están en el interior de una pieza cilíndrica 16 que tiene una tapa 17 en su extremo superior abierto. El extremo inferior 18 del cilindro 16 está cortado a bisel, o en pendiente, y está cerrado por la pared inclinada 19. El extremo superior de la columna 11 también está cortado a bisel, y la abertura 14 de la misma está situada en el mismo plano que la pared inclinada 19. De este modo, el líquido que hay en el cilindro 16 escurre a través de esta abertura 14 y cae en la columna 11. La columna 12 penetra en el cilindro 16 hasta una cierta distancia, y termina en una parte extrema abocinada, 20. En funcionamiento normal, el cilindro 16 está lleno con líquido hasta un cierto nivel indicado por 21, y en este líquido están introducidos un control 22 indicador del pH y un dispositivo 23 indicador de la temperatura. En 24 hay un escape que permite pasar a los gases al exterior.

Las columnas 11 y 12 están construídas de secciones, como se muestra en el dibujo, aunque puede emplearse cualquier otra construcción adecuada. Entre cada dos secciones adyacentes hay unas juntas herméticas al agua. Un tubo 25 de entrada de aire lleva aire desde una fuente que no se muestra hasta un dispositivo de burbujeo 26 situado por de



bajo de la parte central de la columna 12. En 27 hay un tubo de descarga provisto de una válvula, para extraer muestras.

5 Aunque se pueden emplear varios materiales en la construcción del aparato, las columnas pueden ser adecuadamente de vidrio, el cilindro de metal, la tapa de material transparente, y las juntas de material plástico de Teflon.

10 El aparato puede hacerse funcionar quitando la tapa 17, e introduciendo por el extremo abocinado 20 de la columna 12, en las proporciones deseadas, el material nutriente mineral acuoso y el hidrocarburo. Se añade material suficiente para llenar la columna 11, la columna 12 hasta el nivel indicado por 21, y el cilindro 16 hasta el mismo nivel. También hay presente un microorganismo, añadido al material antes o después de introducir éste en el aparato. En 15 la columna 12 se hace entrar aire, a través del burbujeador, a la velocidad deseada, siendo ésta como mínimo suficiente para mover el líquido hacia arriba en la columna 12, hacer que rebose por la parte superior 15 de la misma, y 20 caiga en la parte inferior del cilindro 16. Así se crea una circulación, según las flechas del dibujo, pasando el líquido de la columna 11 a la columna 12, y descendiendo por gravedad el líquido del cilindro a la columna 11. La velocidad de esta circulación puede estimarse visualmente y controlarse 25 ajustando la velocidad del aire.

30 La mezcla de cultivo del aparato puede calentarse de cualquier forma adecuada, por ejemplo insertando una varilla u otro dispositivo calentado eléctricamente (no se muestra) en el líquido del cilindro 16, o de cualquier otra manera que se desee. Pueden emplearse medios automáticos de

377035



control de la temperatura, de tipo convencional, para mantener una temperatura constante. El control del pH se efectúa por medio del instrumento 22, y, si es necesario, se hacen de vez en cuando los ajustes adecuados por adición apropiada de una sustancia alcalina o ácida. El aire que se recoge en el cilindro 16 es expulsado a la atmósfera a través de la conducción 24, juntamente con cualquier otro gas.

Se observará que la corriente de aire introducida a través de la conducción 25 no sólo introduce oxígeno en el sistema, sino que también proporciona la agitación de la muestra y causa su movimiento de una columna a la otra. El transporte y la agitación determina un buen contacto entre las células y los demás componentes de la muestra. Un caudal típico de aire es 2'8 litros por minuto por litro de líquido en condiciones estándar, aunque el caudal puede aumentarse hasta 5, 10 o más veces este valor, o disminuirse hasta el 20% ó el 10%, o menos, de este valor.

El funcionamiento del método anterior puede hacerse de manera discontinua o continua. En el primer caso, la carga inicial de mezcla de cultivo es mantenida durante todo el procedimiento, no habiendo adiciones ni, salvo las muestras de ensayo, extracciones. En el segundo caso, se hacen adiciones y extracciones, bien de modo continuo o intermitente, en el transcurso de una operación.

En una operación discontinua, la circulación de la mezcla entre las columnas 11 y 12 puede hacerse durante el tiempo que se desee, pero usualmente se detiene cuando ya no hay más aumento del desarrollo celular. El desarrollo puede seguirse extrayendo muestras de ensayo de la mezcla de vez en cuando a través de la conducción 27, y analizándola

377035



las por medio de medidas de densidad óptica, como se describe más adelante en el Ejemplo 1. Cuando se decide detener la fermentación, se cierran la circulación de aire y la aportación de calor, y la mezcla es descargada del sistema a través de la conducción 27, llevándola a un depósito de sedimentación, en el que se efectúa la separación de fases dejando reposar la mezcla, aunque pueden emplearse otros medios de separación. Una de las ventajas de la invención es que la separación de fases, efectuada por reposo, puede seguirse casi espontáneamente, o en cuestión de segundos, y generalmente en menos de un minuto. La fase de aceite asciende a la parte superior del depósito de sedimentación, es extraída, y conservada para su empleo en otra operación. La fase acuosa, en la que se recogen las células, es sometida a una operación adecuada de separación, tal como una filtración, centrifugación, sedimentación, etc., con lo que se recuperan las células. El material nutritivo mineral acuoso resultante, ya usado, puede tratarse, si se desea, para recuperar cualquier producto químico de interés, y si esto no es factible o no se desea, puede desecharse, o utilizarse de nuevo si está justificado.

Pueden obtenerse producciones de células de hasta 20 g/l de mezcla de cultivo, o más. En comparación, puede obtenerse una producción de no más de aproximadamente 5 g/l. utilizando una mezcla de cultivo en forma de una emulsión de aceite en agua.

En una operación continua son aplicables los procedimientos empleados en una discontinua, salvo en que se hacen adiciones de hidrocarburo y sustancia nutritiva mineral acuosa, y extracciones de mezcla de cultivo, en el trans

377035



curso de la operación, bien de un modo intermitente o continuo. Estas adiciones y extracciones se equilibran, no sólo para mantener la cantidad o nivel de la mezcla de cultivo en el aparato, sino también para mantener el estado de la emulsión, es decir, una emulsión de agua en aceite, de composición sustancialmente constante. La mezcla de cultivo extraída puede ser dividida en fases continuamente, utilizándose de nuevo la fase de aceite, por ejemplo por reciclado, y extrayéndose y recuperándose las células de la fase acuosa. La fase acuosa usada puede utilizarse de nuevo tal como está, o puede reconstituirse primero por adición de sales minerales y utilizarse después; o bien, si su estado se considera inadecuado, puede ser purificada separando los productos tóxicos, o puede ser desechada. Si se desea, algunas de las células producidas pueden ser recicladas, bien antes o después de su separación de la fase acuosa, ya que este reciclado puede dar cierto estímulo para el desarrollo posterior. Las extracciones y adiciones pueden iniciarse en cualquier momento deseado, bien en el punto de máxima concentración o desarrollo de las células, o en algún punto anterior; preferiblemente se inician en un momento subsiguiente al comienzo de la fermentación. El punto de máximo desarrollo puede establecerse fácilmente, por ejemplo construyendo un gráfico de variación de la concentración celular en función del tiempo. Una ventaja de una operación continua es que da una producción continua de células en un aparato dado. Otra ventaja es que los productos tóxicos, es decir productos tóxicos para las células, que tienden a reunirse en la fase acuosa, pueden ser extraídos continuamente del sistema.

377035



Es posible añadir a la mezcla de cultivo una sustancia que absorbe y desprende oxígeno, y preferiblemente una superior a este respecto al hidrocarburo. Esta sustancia o compuesto puede absorber oxígeno del aire introducido, y en algún punto posterior de la circulación de la mezcla de cultivo liberar o desprender al menos parte del oxígeno para las células. De esta manera puede suministrarse una mayor cantidad de oxígeno a las células, para que éstas lo utilicen. Un compuesto de interés para este fin es la hemoglobina, un material soluble en agua que comprende un complejo de una parte de pigmento que contiene hierro, llamada heme o hemina, con una proteína llamada globina. La hemoglobina tiene la capacidad de combinarse débilmente con oxígeno molecular, formando oxihemoglobina, pero la unión es débil, y puede descomponerse bajo condiciones relativamente simples, tales como un cambio en la presión parcial de oxígeno o del pH, formando oxígeno y hemoglobina reducida. Así pues, la hemoglobina puede absorber oxígeno en una zona de presión parcial de oxígeno más alta, y dejarlo en libertad en una zona de inferior presión parcial de oxígeno. Estas zonas pueden identificarse en el aparato de la Figura 1; la primera es adyacente y está precisamente encima del aire introducido en la columna 12, y la segunda está más alejada de esta corriente de aire, por ejemplo en la columna 11.

El complejo de hemoglobina puede ser dividido en heme y globina. El heme es capaz de combinarse con otras varias proteínas, como la albúmina, y con bases como la piridina, nicotina, amoníaco, etc, produciendo hemopiridina, hemonicotina, etc. En conjunto, estos compuestos se denominan

377035



hemocromógenos. Reaccionan con el oxígeno de modo similar a la hemoglobina, y tienen un uso similar. Puede observarse que la propia hemoglobina es un hemocromógeno. La hemoglobina se encuentra en la sangre de todos los vertebrados. El heme está aún más ampliamente distribuido en la naturaleza, y puede emplearse para formar un complejo con una base que contiene nitrógeno o con una proteína deseada.

La invención puede ser ilustrada por medio de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

En una operación discontinua, se preparó una mezcla de cultivo que comprendía 6'5 litros de n-hexadecano, 3'0 litros de medio nutricio mineral acuoso fresco de la composición expuesta en la Tabla 1, y 250 mg. de Brevi-bacterium sp. La mezcla tenía un pH de 7'0. Fué introducida en un fermentador de inyección de aire, del tipo ilustrado y de unos 10 litros de capacidad, calentada a 36°C, y se hizo burbujear aire a su través a un caudal de aproximadamente 5l litros/min. A medida que tuvo lugar el desarrollo, el pH de la mezcla descendió a 6'0, valor en el que se mantuvo por adición de hidróxido de amonio. Periódicamente se añadieron agua y n-hexadecano para reponer las pérdidas por evaporación.

La concentración de las células se midió periódicamente por determinaciones de densidad óptica, hechas en muestras totales o completas de mezcla de cultivo. Un cc. de muestra del fermentador fué diluída con 8 a 10 cc. de 2-propanol, centrifugada, y después redispersada en agua en preparación para una medida de densidad. La centrifugación de cada muestra demostró que la fase líquida de la misma se

377035



componía de aproximadamente $2/3$ de aceite y $1/3$ de agua o medio acuoso. El teñido con un colorante soluble en agua (Nigrosina) reveló que la fase líquida era una emulsión de agua en aceite.

5 A todas las concentraciones de células se encontró que la fase acuosa de las muestras extraídas era capaz de separarse de la fase de hidrocarburo en aproximadamente 20 segundos, un fenómeno no observable en el caso de un medio de cultivo que comprende una emulsión de aceite en agua.

10 Gracias a esta rápida separación de fases, se formó una fase acuosa exenta de espuma, que contenía la mayoría de las células; sobre ella estaba la fase de hidrocarburo. Pasados aproximadamente 10 minutos, se observó una neta separación de las células por sedimentación en la fase acuosa, no habiendo presentes gotitas de aceite dispersadas. La densidad

15 óptica se midió tomando muestras de mezcla de cultivo y determinando la absorción de rayos de luz visible de una longitud de onda de 400 milimicras (0.4 micras) en un colorímetro Bausch y Lomb. En la tabla siguiente se muestra el aumento de desarrollo de células e intervalos periódicos durante todo el experimento.

20



Tabla 3

	<u>Tiempo de operación, horas</u>	<u>Concentración de células, g/l.</u>	<u>Tiempo de operación, horas</u>	<u>Concentración de células, g/l.</u>
5	1	0'15	11	5'9
	2	0'25	12	7'1
	3	0'35	13	7'8
	4	0'5	14	7'95
	5	0'65	15	8'05
10	6	0'9	16	8'1
	7	1'3	17	8'15
	8	2'2	18	8'25
	9	3'3	19	8'3
	10	4'3	20	8'3
15			25	8'4

Es evidente que el desarrollo celular aumentó continuamente durante todo el experimento. A partir de aproximadamente la 7^a hora y continuando hasta aproximadamente la hora 13^a, el aumento de desarrollo fué acusado, aumentando la concentración de 1'3 a 7'8 g/l. Si los datos se representan gráficamente para obtener una curva de concentración en función del tiempo, se observa que este brusco aumento corresponde a una parte casi vertical de la curva. De la hora 13^a a la hora 25^a, el desarrollo se hizo menos rápido, pero aún era continuo. Se alcanzó un valor alto de 8'4.

Ejemplo 2

En otro experimento efectuado de sustancialmente la misma manera que en el ejemplo anterior, la producción de células alcanzó un máximo de aproximadamente 20 g/l. Se cree que en este experimento la contaminación de la mezcla

377035



de cultivo por productos tóxicos fué probablemente un factor menos importante que en el caso anterior.

5

N O T A

10

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:

15

1.- Un método de cultivar un microorganismo que utiliza hidrocarburos, que comprende incubar el microorganismo en presencia de oxígeno y un hidrocarburo, como única fuente de carbono para los requerimientos de energía y desarrollo, en una mezcla de cultivo en forma de una emulsión de agua en aceite, comprendiendo la fase acuosa de la emulsión una disolución nutritiva acuosa de sales minerales, y comprendiendo la fase de aceite el hidrocarburo, y recolectar las células a partir de la fase acuosa.

20

2.- Un método según la reivindicación 1, en el que la emulsión es mantenida agitando la mezcla.

25

3.- Un método según la reivindicación 2, en el que la mezcla es agitada haciendo burbujear a través de la misma el gas que contiene oxígeno.

30

4.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la mezcla contiene un compuesto que es capaz de absorber oxígeno y desprenderlo a las células en la fase acuosa.

5.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la mezcla contiene un hemocromógeno.

377035



8

6.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la mezcla de cultivo contiene al menos 35% en volumen del hidrocarburo.

5

7.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el cultivo se efectúa continuamente, con separación de la mezcla de cultivo y adiciones de la sustancia nutritiva acuosa de sal mineral y del hidrocarburo.

10

8.- Un método de cultivar un microorganismo que utiliza hidrocarburos.

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

15

Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 8 ABR. 1910
P.A.

For Foreign
[Handwritten signature]

377035

371035

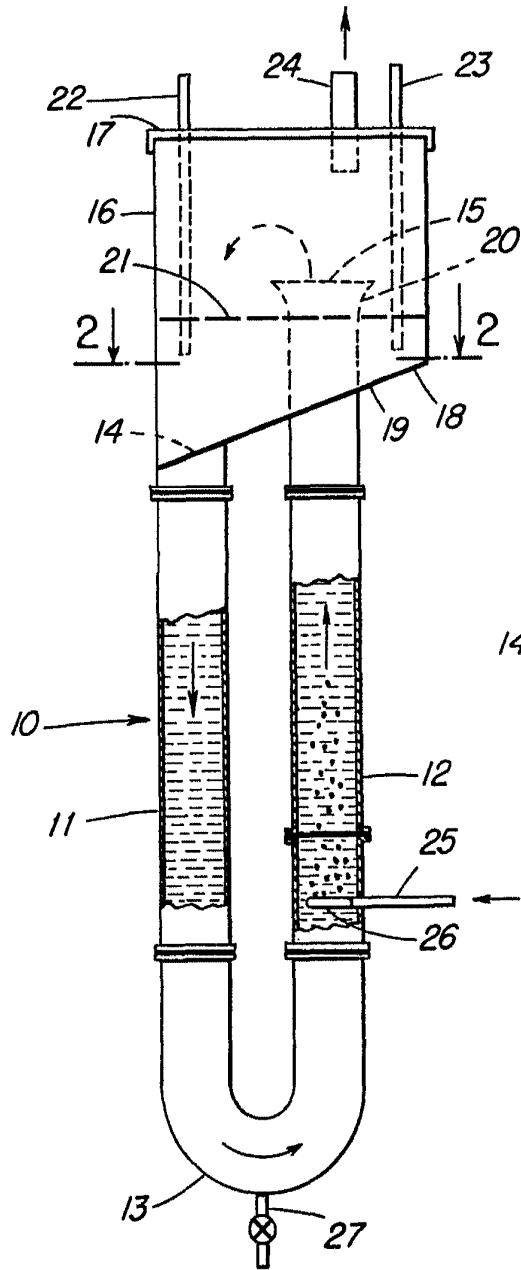


FIG. 1

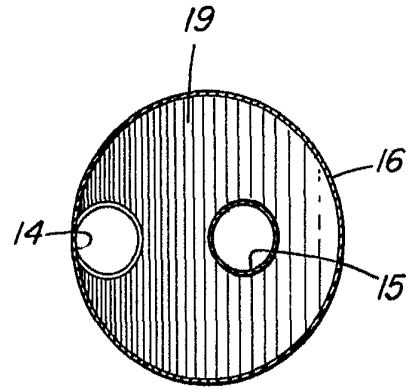


FIG. 2

For Patent
Carta