

U06191



PATENTE DE INVENCION

por 20 años

por "Un procedimiento continuo para convertir metano en materiales proteínicos"-

a favor de: THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, de nacionalidad británica, domiciliada en Britannic House, Moor Lane, LONDRES ( Inglaterra ).

-----

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación para convertir metano en materiales proteínicos. En particular la invención se refiere a un procedimiento continuo para la producción de microorganismos usando metano como un substrato de carbono.

Se han descrito procedimientos para la producción de microorganismos en los que utilizando metano son cultivados microorganismos en un caldo acuoso conteniendo sales nutrientes, en presencia de metano y un gas conteniendo oxígeno libre. En tales procedimientos los nitratos; sales de amonio, por ejemplo cloruro o sulfato amónico; o amoniaco o hidróxido amónico han sido usados como substrato de nitrógeno.



Nosotros ahora hemos comprobado en procedimientos con-  
tínuos que el uso de iones amonio como un substrato de nitró-  
geno conducen a una reducción en la proporción de desarrollo  
del microorganismo que utiliza metano, de la cual resulta fi-  
nalmente la muerte de los microorganismos a no ser que se to-  
men los siguientes especiales pasos que nosotros hemos encon-  
trado se han de tomar.

En consecuencia la presente invención es un procedimien-  
to contínuo para convertir métnano en materiales proteínicos -  
el cual comprende el cultivo de un microorganismo que utiliza  
metano continuamente bajo condiciones de estado permanentes -  
para una proporción de producción de a lo menos 0,81 gramos  
(peso seco) de microorganismos por litro hora en un caldo -  
acuoso que contiene sales nutrientes e iones de amonio, en -  
presencia de metano y un gas conteniendo oxígeno libre, en el  
que el pH del caldo es mantenido en el orden de 4,5 a 8,0 y -  
la concentración ion amonio es mantenida en el orden de 2 a  
100 miligramos por litro.

El presente procedimiento se basa en nuestro descubri-  
miento de que, en cultivo contínuo a elevadas proporciones de  
producción por ejemplo del orden de 0,81 a 5,0 gramos (peso se-  
co) de microorganismos por litro hora, la máxima concentración  
ion amonio que utilizando metano el microorganismo puede tole-  
rar en el caldo es apróximadamente 100 miligramos por litro.  
Nosotros hemos comprobado, en procedimientos para el contínuo  
cultivo de microorganismos que usan metano en proporciones de  
dilución dadas, que la presencia en el caldo de concentracio-  
nes de ion amonio sobre ciertos niveles críticos tiene el efec-  
to de disminuir la proporción de desarrollo suficientemente -  
para causar la "muerte" del cultivo.



Preferiblemente la cantidad de iones amonio no debe exceder de 80 miligramos por litro y debe ser mantenida en el orden de 2 a 50 miligramos por litro. Por debajo de 2 miligramos por litro se considera el desarrollo limitado por falta de nitrógeno amoniacal pero este valor no ha sido precisamente definido y es el limite de detección para los métodos usados para la estimación de los iones amonio. En operación del procedimiento la mayor parte de los iones amonio adicionales al caldo acuoso, preferiblemente como amoniaco o hidróxido amónico, son utilizados inmediatamente por los microorganismos. Los iones amonios restantes son luego controlados dentro del campo requerido. En la práctica el procedimiento es generalmente operado a una concentración de ion amonio de aproximadamente 10 a 30 miligramos por litro.

La concentración de ion amonio en el caldo puede ser estimada por muestreo del caldo e intervalos ejecutado por una estimación quimios cuantitativa de los iones amonio. Por ejemplo - apropiados métodos calorimétricos basados en Nesslerización están descritos por Paul J. (1.958) en el Analyst, volumen 83 páginas 37-42 y Meynell, G. G. y Meynell E. (1.965) Theory and Practice in Experimental Bacteriology, Cambridge University Press. Alternativamente una prueba, preferiblemente una " prueba amoniaco" en combinación con un registrador pH, puede ser usada para estimar continua o discontinuamente la concentración ion amoniaco en el caldo . Tal prueba y registrador son fabricados por Electronic Instruments Ltd. de Gran Bretaña.

Preferiblemente los iones amonio son establecidos por adición ya sea de amoniaco o de hidróxido amónico al caldo.

Convenientemente el procedimiento puede ser operado usando una u otra de las técnicas siguientes:



(a) restringiendo el pH del medio nutriente acuoso adicio-  
nado al caldo y controlando el pH del caldo por adición de  
iones amonio en réplica a los cambios pH en el caldo. El pH del  
medio acuoso adicionado al caldo es tal que la concentración  
5 ion hidrógeno resultante en el caldo no debe requerir la presen-  
cia de más que 100 miligramos por litro de iones amonio para el  
control pH.

o (b) manteniendo una concentración ion amonio en el caldo del  
orden de 2 a 100 miligramos por litro en réplica a los medios de  
10 valoración de la concentración en el caldo. El pH del caldo es  
controlado por adición de un álcali que no sea amoniaco o hidró-  
xido amónico o por adición de un ácido.

Cuando se usa amoniaco o hidróxido amónico tanto en el subs-  
trato de nitrógeno como en los medios para la controlación del -  
15 pH del caldo, de acuerdo con la técnica (a) definida arriba el  
medio nutritivo adicionado al caldo debe tener un pH menor que  
7,5 y tener un valor que sea suficientemente inferior al pH del  
caldo de modo que la concentración de hidrógeno resultante en el  
caldo sea tal que la cantidad de iones amonio requerida en cual-  
20 quier momento dado del control del pH del caldo no exceda los -  
100 miligramos por litro.

El pH del medio acuoso generalmente estará en el orden de  
1,0 a 7,5 y principalmente en la práctica propuesta estará en el  
orden de 2,0 a 3,5.

25 El medio acuoso puede ser elegido de ,0 basada en, cualquier  
medio conocido usado en las fermentaciones de metano del cual -  
parte o toda fuente de nitrógeno ha sido omitida. La cantidad de  
cada uno de los nutrientes debe ajustarse para asegurar que el  
medio pueda mantener el irrestringido desarrollo del microorga-  
30 nismo a la proporción deseada.



5 El pH natural del medio puede depender de la composición de las sales nutrientes y puede ser demasiado alto o demasiado bajo para el presente propósito, en consecuencia un ácido o un álcali puede ser requerido para ajustarle al pH deseado. El pH de un medio  
10 conteniendo sales de fosfato de potasio y, o, de sodio como la fuente de fosfato puede ser demasiado alto y será necesario adicionar, por ejemplo, ácido sulfúrico o fosfórico. Por otra parte el pH de un medio conteniendo ácido fosfórico como fuente de fosfato puede ser demasiado bajo y puede ser necesario adicio-  
15 nar un álcali por ejemplo hidróxido sódico. El valor del pH del medio que se requiere depende de la densidad celular y del pH que se desea para operar la fermentación. La densidad celular puede depender, por ejemplo, de la proporción de transferencia de oxígeno cuando el oxígeno es el nutriente límite para una proporción de dilución dada, o de la proporción de transferencia de metano cuando el metano es el nutriente límite. El pH preciso requerido puede ser determinado empíricamente por simples experimentos para cada caso particular de condiciones de fermentación.

20 Convenientemente amoniaco o hidróxido amónico puede ser adicionado al caldo en rendimiento por un valorador automático el cual comprende un electrodo para medir el cambio pH en el caldo y medios para la adición de amoniaco o hidróxido amónico al caldo en rendimiento a tales cambios de modo de mantener un deseado pH en la fermentación.

25 La cantidad de amoniaco o hidróxido amónico adicionado de esta forma es igual a la suma de la cantidad de iones amonio requerida para inrestringir el desarrollo del microorganismo y la cantidad requerida para controlar el pH del caldo por neutralización del exceso de iones hidrógeno derivadas del medio acuoso adicio-  
30 nado al caldo con propósito nutricional.



Cuando se desea usar un medio nutriente acuoso sin la precedente restricción pH puede usarse la técnica (b). La técnica comprende el manteniendo del pH del caldo en el orden de 4,5 a 8,0 por adición de un ácido o un álcali que no sean amoniaco o hidróxido amónico y mantención de la concentración ion amonio -  
5 del caldo en el orden de 2 a 100 miligramos por litro preferiblemente por adición de amoniaco o hidróxido amónico, con réplica a los medios para estimar la concentración de iones amonio en el caldo.

10 La concentración de ion amonio en el caldo puede ser estimada de acuerdo con los métodos previamente descritos.

El hidróxido amónico puede ser adicionado al medio o al - caldo, preferiblemente con una bomba, tal como por ejemplo una convencional bomba dosificadora, la medida de caudal de la bomba  
15 ajustándose ya bien manualmente o automáticamente en rendimiento a la estimada concentración ion amonio en el caldo. El amoniaco líquido o gaseoso puede ser regulado al medio o caldo por medio de un convencional medidor de caudal.

El álcali, que no es amoniaco o hidróxido amónico, que es  
20 usado para controlar el pH del caldo puede ser un hidróxido de un metal alcalino, por ejemplo hidróxido sódico. Acidos convenientes son por ejemplo el ácido sulfúrico o fosfórico.

La precedente técnica facilita el uso de un medio teniendo cualquier pH, no obstante, un medio teniendo un pH inferior a -  
25 4,0 es preferido a fin de mantener las sales minerales en solución.

Lo más conveniente cuando se opera el procedimiento de - acuerdo con alguna de las precedentes técnicas es que el límite superior para el pH del caldo sea 7,5 y preferiblemente se encuentre en el orden de 5,0 a 7,0.  
30



La temperatura de operación puede estar en el orden de 30 a 48°C. Cuando se usa *Methylococcus capsulatus* es preferible - operar a un pH del orden de 6,0 a 7,0 y a una temperatura del orden de aproximadamente 42 a aproximadamente 48°C.

5 El procedimiento es normalmente operado bajo presión atmosférica no obstante sobre presiones de aproximadamente 3,5 Kg por cm<sup>2</sup> pueden ser usadas.

Normalmente la proporción de componentes gaseosos que usan mezclas aire-metano tendrán un contenido de oxígeno de aproximadamente 10 a 19 por ciento y preferiblemente aproximadamente 16 a 18 por ciento por volumen, con un contenido de metano de aproximadamente 10 a 50 por ciento y preferiblemente 15 a 25 por ciento por volumen. El metano en gases que contienen metano puede estar presente, por ejemplo gas natural. Gases enriquecidos de oxígeno tal como aire enriquecido de oxígeno puede ser usado.

15 Las condiciones bajo las cuales el procedimiento puede ser efectuado son selectivas para microorganismos que utilizan metano. No es necesario usar técnicas de fermentación asépticas y, principalmente por razones de economía, la operación no-aséptica es preferida.

20 Los microorganismos pueden ser separados del caldo de cultivo por cualquiera de las técnicas conocidas como centrifugación y, o, filtración que puede ser combinada con una etapa de floculación.

25 Los microorganismos que utilizan metano pueden ser obtenidos usando cualquiera de las conocidas técnicas de aislamiento para este tipo de microorganismos. Convenientes técnicas están descritas por Sheehan and Johnson en "Applied Microbiology", Volumen 21, n°3.1971, páginas 511-515 o por Whittenbury en el Journal of General Microbiology, 1.970, Volúmenes 61 páginas 205-218.

30



La bacteria preferida es la *Methylococcus capsulatus*. Las técnicas de enriquecimiento son particularmente convenientes a fin de obtener una población microbial conteniendo microorganismos utilizando metano para usar en el procedimiento.

5 La presente invención es ilustrada pero sin carácter limitativo con referencia a los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

Etapa A: Método para obtener un cultivo de bacterias que utilizan metano, para usar en el procedimiento.

10 500 mililitros de lechada de depósito estancado de lodo - conteniendo metano fueron adicionados a intervalos diarios durante 5 días a un fermentador agitado por aireación que tenía un volumen de trabajo de 3.0 litros y conteniendo 3.0 litros de un medio acuoso teniendo la siguiente composición:-

15	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1600.0 miligramos por litro
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2928.0 " " "
	$\text{NaNO}_3$	1180.0 " " "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	80.0 " " "
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.0 " " "
20	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.0 " " "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.34 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.30 " " "
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.24 " " "
25	Agua desmineralizada para	1000 mililitros
	por 1000 mililitros	
	pH	6.2

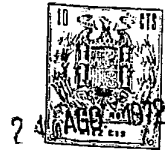


El fermentador fué mantenido a una temperatura de 45°C. a proporción de dilución de 0,084 por hora y a una velocidad de impulsión de 1000 revoluciones por minuto.

5 El pH fué mantenido a 6.7 por la adición de 0.5 N hidróxido sódico como lo requerido. Una mezcla gaseosa, conteniendo 33 por cien por volumen de metano; 64 por cien por volumen de aire y 3 por cien por volumen de dióxido de carbono fué aplicada a la entrada del fermentador a una proporción de fluido de 20 volúmenes por volumen hora.

10 Una población bacteriana utilizando metano se le permitió desarrollarse naturalmente bajo estas selectivas condiciones.

Después de 7 días de operación usando este medio bajo las citadas condiciones la población bacteriana alcanzó una densidad celular de 1.0 gramos en peso seco por litro y tenía la siguiente  
15 composición. Solamente un linaje de bacteria que utiliza metano pudo ser aislado de esta población. Los otros tipos de bacterias no fueron aptos para utilizar metano. La proporción de bacterias utilizando metano respecto a los otros tipos de bacterias fué aproximadamente 90 a 95 por ciento por número. La bacteria  
20 que utiliza metano fué un coccus que tenía un diámetro de aproximadamente 1,1 a 1,4 micrones. Tenía forma de cápsula y era capaz de utilizar metano y metanol pero no glucosa. Un medio sólido hecho por adición de 1.0 por ciento de agar al medio de fermentación descrito inicialmente, después de incubación durante  
25 3-4 días a 45°C bajo una atmósfera de aire-metano (50-50 volumen), las colonias tenían la siguiente morfología. El diámetro era aproximadamente 1-2 milímetros, y la apariencia era blanca, uniforme y redondeada. Estas características concuerdan en todo respecto con aquellas de un linaje Methylococcus capsulatus,  
30 como el descrito por J. W. Foster y R. H. Davis (1966) Journal



of Bacteriology, Vol. 91, p. 1924 y por R. Whittenbury, K. C. Phillips y J. F. Wilkinson (1970), Journal of General Microbiology, Vol. 61, p. 205.

5 Etapa B:-Etapa intermedia para producir la densidad celular por continuo estado de operación.

3.0 litros de caldo de cultivo conteniendo la población bacterial que utiliza metano obtenidos de acuerdo con la etapa A, se usaron para iniciar una operación continua en un fermentador agitado teniendo un volumen de trabajo de 3.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué alimentado 10 continuamente al fermentador.

	$KH_2PO_4$	335.0 miligramos por litro
	$NA_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	277.5 " " "
	$NaN_3$	1193.8 " " "
15	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	160.0 " " "
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	90.0 " " "
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	4.6 " " "
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	14.5 " " "
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6 " " "
20	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.8 " " "
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.03 " " "
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.3 " " "
	$H_2SO_4$ ( 36 <u>N</u> )	0.34 mililitros por litro
	$HNO_3$ ( 13.6 <u>N</u> )	3.1 " " "
25	Agua desmineralizada	para 1000 mililitros
	pH	1.3

El fermentador fué mantenido a una temperatura de 45°C. una proporción de dilución de 0.18 y a una velocidad de impulsión de 1500 revoluciones por minuto. Una proporción de fluido



de gas de 30 volúmenes por volumen hora fué aplicada al fermentador. El gas consistía de 20 por ciento por volumen de metano y 80 por ciento por volumen de aire. Después de unos pocos minutos iniciales donde el pH fué controlado con 1.0 N NaOH el pH fué después controlado a 6.0 por la adición de 1.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 1.0 N NaOH según lo requerido por el valorador automático. La fermentación fué operada hasta que la densidad celular ascendió a aproximadamente 5.0 gramos ( peso seco ) por litro. El medio fué luego cambiado al siguiente:

10	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	722.5 miligramos por litro
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	375.0 " " "
	KCl	250.0 " " "
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37.5 " " "
	CaCl <sub>2</sub>	75.0 " " "
15	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	15.0 " " "
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.25 " " "
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.75 " " "
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 " " "
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.35 " " "
20	NaOH	250.0 " " "
	Agua desmineralizada	para 1000 mililitros
	pH	3.0

Etapa C: Estado de operación constante usando hidróxido amónico como fuente de hidrógeno y para controlar el pH del caldo.

25 El pH fué controlado a 6.0 por la adición de 1.1 N hidróxido amónico desde un valorador automático en réplica a los cambios pH del caldo. La fermentación fué operada bajo estado de condiciones constantes durante un período mínimo de 7 días.



La densidad celular bajo estas condiciones establecidas a -  
aproximadamente 5.0 gramos por litro dando una proporción de  
producción bacteriana celular de aproximadamente 0.9 gramos -  
( peso seco ) por litro hora. El factor productor en metano,  
5 es decir peso de células producidas ( peso seco ) por unidad  
de peso de metano consumido en la fermentación fué 0.66. El  
factor producto en oxígeno fué 0.21.

Los siguientes resultados son característicos de aquellos  
obtenidos durante el experimento.

10	Tiempo ( horas )	Medio de entrada ( ml/hora )	Densidad celular (gramos/l)	Exceso de con- centración de $NH_4^+$ en el caldo (mg/litro)
	0	510	4.9	16.2
	12	"	5.1	7.5
15	24	"	4.9	12.3
	36	"	5.0	10.9
	48	"	5.2	9.2
	60	"	5.1	20.3
	72	"	4.9	31.7
20	84	"	5.0	25.5
	96	"	5.0	18.4

El exceso de concentración de ion amonio fué estimado  
en 10 ml. de muestras de caldo usando una técnica calorimé-  
trica.

25 Los resultados de arriba demuestran que usando un medio  
que tenga un preciso valor pH designado específicamente para  
una fermentación bajo precisas condiciones de estado constan-  
tes, el exceso de acidez en el caldo de fermentación es limi-



tada a un nivel que pide solamente muy limitada neutralización por hidróxido amónico. Esta cantidad de hidróxido amónico causa un exceso de concentración de ion amonio en el caldo que está normalmente entre 7.5 y 31.7 miligramos por litro. La mayor parte de hidróxido amónico adicionado a la fermentación fué inmediatamente utilizada como una fuente de nitrógeno para desarrollar el cultivo bacterial que utiliza metano.

EJEMPLO 2

3.0 litros de caldo de cultivo conteniendo a la población bacterial que utiliza metano obtenida de acuerdo con el aislamiento y densidad celular fundada en las etapas A y B del Ejemplo 1 fueron usados para iniciar una operación continua de producción fermentadora teniendo un volumen de trabajo de 3.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué alimentado continuamente al fermentador:-

15	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	335.0 miligramos por litro
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	277.5 " " "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200.0 " " "
	$\text{CaCl}_2$	50.0 " " "
	$\text{NaSO}_4$ (anhidrido)	500.0 " " "
20	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.0 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.2 " " "
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.0 " " "
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 " " "
25	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0 " " "
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	2.3 miliequivalentes por litro.
	Agua desmineralizada	aproximadamente un litro
	pH	3.1



- 14 -

Etapa C: Estado de operación constante usando hidróxido amónico como fuente de nitrógeno y para controlar el pH del caldo.

5 El fermentador fué mantenido a una temperatura de 45°C a una proporción de dilución de 0.18 y a una velocidad de impulsión de 1500 revoluciones por minuto. Una proporción de flujo de gas de 30 volúmenes por volumen hora fué aplicada al fermentador. El gas consistía de 20 por cien por volumen de metano y 80 por cien por volumen de aire.

10 El pH fué controlado a 6.0 por adición de 1.1 N hidróxido amónico como se requiere. La fermentación fué operada bajo estado de condiciones constantes durante 7 días. La densidad celular bajo estas condiciones fueron 4.5 gramos por litro con una proporción de producción bacterial celular de 0.81 gramos  
15 ( peso seco ) por litro hora. El factor producto en metano, es decir peso de células producidas ( peso seco ) por unidad de peso de metano consumido en el fermentador fué 0.66.

El factor producto en oxígeno fué 0.21.

20 Por adición al caldo de un medio nutriente acuoso teniendo un pH de 3.1 y conteniendo 2.3 miligramos por litro de ácido sulfúrico a una proporción de dilución de 0.18 por hora la concentración de ion hidrógeno resultante en la fase acuosa - fué tal que la cantidad de iones amonio requerida en dicha fase en cualquier momento dado para controlar el pH a 6 bajo  
25 continua operación de estado constante varía en el orden de 5.0 a 50 miligramos por litro. El hidróxido amónico fué usado como fuente de nitrógeno y como el medio de controlar el pH del caldo.



Ejemplo 3

Etapa B: Etapa intermedia para producir la densidad celular por continuo estado de operación.

5.0 litros de caldo de cultivo conteniendo la población bacteriana que utiliza metano obtenida de acuerdo con la Etapa A del Ejemplo 1, fueron usados para iniciar una operación continua en un fermentador agitado que tiene un volumen de trabajo de 5.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué alimentado continuamente al fermentador:

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	782.0 miligramos por litro
10	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	647.5 " " "
	$\text{NaNO}_3$	2785.5 " " "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	373.0 " " "
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	210.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10.6 " " "
15	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33.8 " " "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.3 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.8 miligramos por litro
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06 " " "
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.75 " " "
20	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (36 N)	0.8 mililitros por litro
	$\text{HNO}_3$ (13.6 N)	7.3 " " "
	Agua desmineralizada para	1000 mililitros
	pH	1.3



El fermentador fué operado a una temperatura de 45°C, a proporción de dilución de 0.18 h<sup>-1</sup> y a una velocidad de impulsión de 3000 revoluciones por minuto . Una proporción de flujo de gas de 66 volúmenes por volumen hora fué aplicada a la entrada del fermentador. El gas consistía de 18.2 por cien por volumen de metano y 81.8 por cien por volumen de aire. El pH fué ajustado a 6.1 y después controlado a 6.1 por adición de 1.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 1.0 N NaOH en solución como se requiere desde un valorador automático.

Bajo estas condiciones la densidad celular acrecentada gradualmente a aproximadamente 14 gramos (peso seco), por litro. En esta etapa, el medio fué cambiado al siguiente:

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	937.5 miligramos por litro
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	787.5 " " "
15	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	562.5 " " "
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50.6 " " "
	CaCl <sub>2</sub>	112.5 " " "
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	20.5 " " "
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5 " " "
20	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.7 " " "
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5 " " "
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5 " " "
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	225.0 " " "
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (36 N)	0.2 mililitros por litro
25	Agua desmineralizada	para 1000 mililitros
	pH	2.6



Etapa C: Estado de operación constante usando hidróxido amónico como fuente de nitrógeno y para controlar el pH del caldo.

El pH del caldo de fermentación fué controlado a 6.1 por la adición de 1.1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  en solución desde un valorador automático en rendimiento a cambios de pH del caldo. El hidróxido amónico servía como fuente de nitrógeno para el desarrollo y de agente neutralizador.

La densidad celular bajo estas condiciones establecida - aproximadamente a 14 gramos en peso seco por litro. La fermentación fué operada bajo condiciones de estado constante durante un período mínimo de 7 días. La proporción de producción bacteriana fué aproximadamente 2.5 gramos (peso seco) de células producidas por litro hora. La concentración de ion amonio en exceso en el caldo fué estimada de acuerdo con la técnica descrita en el Ejemplo 2.

Los siguientes resultados son característicos de aquellos obtenidos durante el experimento:

	Tiempo (horas)	Medio de entrada (ml/hora)	Densidad celular (g/litro)	Exceso de concentración de $\text{NH}_4$ en el caldo (mg/litro)
20	0	820	14.1	14.4
	12	"	14.0	11.5
	24	"	14.1	9.2
	36	"	14.0	10.4
	48	"	14.0	18.3
25	60	"	14.1	17.6
	72	"	14.2	20.4
	84	"	14.1	21.2
	96	"	14.0	18.5



Ejemplo 4

Etapa B: Etapa intermedia para producir la densidad celular por continuo estado de operación.

5.0 litros de caldo de cultivo conteniendo la población bacteriana asimiladora de metano, obtenidos de acuerdo con la Etapa A del Ejemplo 1, fueron usados para iniciar una operación continua en un fermentador agitado que tenia un volumen de trabajo de 5.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué alimentado continuamente al fermentador.

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	782.0 miligramos por litro
10	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	647.5 " " "
	$\text{NaNO}_3$	2785.5 " " "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	373.0 " " "
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	210.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10.6 " " "
15	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33.8 " " "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.3 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.8 " " "
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06 " " "
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.75 " " "
20	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (36 N)	0.8 mililitros por litro
	$\text{HNO}_3$ (13.6 N)	7.3 " " "
	Agua desmineralizada para	1000 mililitros
	pH	1.3

El fermentador fué operado a una temperatura de 45°C, proporción de dilución  $0.10\text{h}^{-1}$  y a una velocidad de impulsión de 3000 revoluciones por minuto . Una proporción de fluido de gas



de 66 volúmenes por volumen hora fué aplicada a la entrada del fermentador. El gas consistía de 18.2 por ciento por volumen de metano, y 81.8 por ciento por volumen de aire. El pH fué ajustado a 6.1 y después controlado a 6.1 por adición de -  
5 1.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 1.0 N NaOH en solución ( como se requiere ) - desde un valorador automático.

Bajo estas condiciones, la densidad celular se acrecentó gradualmente a aproximadamente 25 gramos ( peso seco ) por litro. En esta etapa el medio fué cambiado al siguiente.

10	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1875.0 miligramos por litro
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1575.0 " " "
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1125.0 " " "
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	101.4 " " "
	CaCl <sub>2</sub>	225.0 " " "
15	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	41.0 " " "
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.0 " " "
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.4 " " "
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.9 " " "
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 " " "
20	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	450.0 " " "
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (36 <u>N</u> )	0.4 mililitros por litro
	Agua desmineralizada para 1000 mililitros	
	pH	2.3

25 Etapa C: Estado de operación constante usando hidróxido amónico como fuente de nitrógeno y para controlar el pH del caldo.

El pH del caldo de fermentación fué controlado a 6.1 por la adición de 1.1 N NH<sub>4</sub>OH en solución desde un valorador



automático en rendimiento a cambios de pH en el caldo. El hidróxido amónico sirvió como fuente de nitrógeno para el desarrollo y de agente neutralizador.

5 La densidad celular bajo estas condiciones establecida  
aproximadamente a 25.0 gramos ( peso seco ) por litro. La fermentación fué operada bajo condiciones de estado constantes durante un período mínimo de 7 días. La proporción de producción bacteriana fué aproximadamente 2.5 gramos ( peso seco ) de células producidas por litro hora. La concentración de ion amonio en exceso en el caldo fué estimada por una técnica calorimétrica.  
10

Los siguientes resultados son característicos de aquellos obtenidos durante el experimento:

	Tiempo horas	Medio de entrada (ml/hora)	Densidad celular (g/litro)	Exceso de concentración de NH <sub>4</sub> en el caldo (mg/litro)
15	0	415	25.0	21.6
	12	"	25.0	22.0
	24	"	24.5	18.0
	36	"	25.0	19.5
	48	"	25.5	17.2
20	60	"	25.0	22.0
	72	"	24.5	25.0
	84	"	24.5	30.2
	96	"	25.0	30.0

EJEMPLO 5

25 Etapa A: Método para obtener un cultivo de bacterias utilizando metano para usar en el procedimiento:

500 mililitros de lechada de depósito estancado de lodo



conteniendo metano fueron adicionados a intervalos diarios durante 5 días a un fermentador agitado por aireación. El fermentador tenía un volúmen de trabajo de 5.0 litros y contenía 5.0 litros de un medio acuoso teniendo la siguiente composición:

5	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1600.0 miligramos por litro
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2928.0 " " "
	$\text{NaNO}_3$	1180.0 " " "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	80.0 " " "
10	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.0 " " "
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.0 " " "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.34 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.30 " " "
15	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.24 " " "
	Agua desmineralizada aproximadamente un litro	
	pH	6.25

El fermentador fué mantenido a una temperatura de 45°C a proporción de dilución de 0.084 por hora y a una velocidad de impulsión de 1000 revoluciones por minuto.

El pH fué mantenido a 6.75 por la adición de 0.5 N hidróxido sódico como se requiere. Una mezcla gaseosa que consistía de 33 por cien por volúmen de metano; 64 por cien por volúmen de aire y 3 por cien por volúmen de dióxido de carbono fué aplicada a la entrada del fermentador a una proporción de fluido de 20 volúmenes por volúmen hora.

Una población bacterial que utiliza metano fué permitida desarrollarse naturalmente bajo estas selectivas condiciones.



Después de 7 días de operación usando este medio bajo las citadas condiciones la población bacteriana alcanzó una densidad celular de 1.10 gramos ( peso seco ) por litro y tenía la siguiente composición. Solamente un linaje de bacteria utilizando metano pudo ser aislado de esta población. Los otros tipos de bacterias no fueron aptos para utilizar metano. La proporción de bacterias que utilizan metano respecto a los otros tipos de bacterias fué aproximadamente 90 a 95 por ciento por número. La bacteria que utiliza metano fué un coccus que tenía un diámetro de aproximadamente 1.1 a 1.4 micrones. Tenía forma de cápsula y capaz de utilizar metano y metanol pero no glucosa. Un medio sólido hecho por adición de 1.0 por ciento de agar al medio de fermentación descrito inicialmente, después de incubación durante 3-4 días a 45°C bajo una atmósfera de aire-metano (50-50 volúmenes), las colonias tenían la siguiente morfología. El diámetro era aproximadamente 1-2 milímetros y la apariencia era blanca, uniforme y redondeada. Estas características concuerdan en todo respecto con aquellas de un linaje de Methylococcus capsulatus como el descrito por J.W.Foster y R.H. Davis (1955) J. BACT. Volúmen 91.1924 y R. Whittenbury, K.C. Phillips, y - J.F. Wilkinson (1970) J. Gen. Microbiology, Volúmen 61.205.

Etapa B: Etapa intermedia para producir la densidad celular por continuo estado de operación.

Los 5.0 litros de caldo de cultivo conteniendo la población bacteriana utilizando metano obtenidos como se ha dicho - fueron usados para iniciar una operación continua de producción en un fermentador que tenía un volumen de trabajo de 5.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué alimentado continuamente al fermentador:



	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	937.5 miligramos por litro
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	787.5 " " "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	562.5 " " "
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	706.0 " " "
5	$\text{CaCl}_2$ (anhidro)	112.5 " " "
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42.7 " " "
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ (anhidro)	225.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20.5 " " "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 " " "
10	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.7 " " "
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 " " "
	Agua	hasta 1 litro
	pH aproximadamente	2.6

15 El fermentador fué operado a una temperatura de  $45^\circ\text{C}$ , a una proporción de dilución de 0.18 y a una velocidad de impulsión de 3000 revoluciones por minuto. Una proporción de fluido de gas de 66 volúmenes por volumen hora fué aplicada a la entrada del fermentador. El gas consistía de 18.2 por ciento por volumen de metano y 81.8 por ciento por volumen de aire. El pH fué

20 ajustado a 6.5 usando NaOH y por tanto controlado a 6.5 por la adición de 1.0 N NaOH como se requiere en réplica a un valorador automático.

25 El nitrógeno fué abastecido como hidróxido amónico (1.1 N) que fué bombeado dentro del fermentador a una proporción gradualmente incrementada para producir una densidad celular de aproximadamente 14 gramos en peso seco. El "exceso" de concentración ion amonio en el caldo cultivado fué estimado por muestras de 10 mililitros de caldo cada 10 minutos y luego determinando la

30 concentración ion amonio usando la técnica calorimétrica descrita



por Paul J. en el Analyst, 1958, Volúmen 83, páginas 37-42  
(o Maynell, G.G. and Meynell, E (1965) Theory and Practice  
of Experimental Bacteriology, Cambridge University Press).  
Alternativamente la concentración ion amonio puede ser esti-  
5 mada por una "prueba amoniaco" en combinación con registrador  
de pH tal como la prueba suministrada por Electronic Instru-  
ments Ltd. (EIL) de GRan Bretaña como Laboratory Model 8002-3  
en combinación con un registrador pH EIL modelo 7030. El "ex-  
ceso" de iones amonio en el caldo fué mantenido a una concen-  
10 tración de 5 a 10 miligramos por litro controlando manualmen-  
te la proporción en la que el hidróxido amónico era bombeado  
dentro del fermentador.

Etapa C: Estado de operación constante usando hidróxido  
amónico como fuente de nitrógeno con un control independiente  
15 del pH usando hidróxido sódico.

Cuando la densidad celular del fermentador en la etapa  
B ha alcanzado 13.5 gramos por litro se empezó la operación  
de estado constante usando las mismas condiciones de fermen-  
tación descritas para la etapa B. El "exceso" de ion amonio  
20 fué mantenido a una concentración de entre 5 y 10 miligramos  
por litro usando una de las técnicas previamente descritas.  
En esta etapa la proporción a la cual el hidróxido de amonio  
fué bombeado en el fermentador fué con la excepción de peque-  
ños ajustamientos prácticamente constante.

25 La fermentación fué operada bajo estado de condiciones  
constante durante 17 días. La densidad celular bajo las pre-  
cedentes condiciones fué 13.5 gramos por litro con una propor-  
ción de producción bacterial celular de  $13.5 \times 0.18$  gramos  
( peso seco ) por litro hora. El factor producto en metano,



es decir el peso de células producidas ( peso seco ) por  
unidad de peso de metano abastecido al fermentador fué -  
0.63. El factor producto en oxígeno fué 0.23.

### EJEMPLO 6

5            Etapa B: Etapa intermedia para producir la densidad  
celular por continuo estado de operación.

3.0 litros de caldo de cultivo conteniendo la pobla-  
ción bacteriana que utiliza metano obtenidos de acuerdo con  
la Etapa A del Ejemplo 1 fueron usados para iniciar una ope-  
ración continua en fermentador agitado teniendo un volúmen  
10 de trabajo de 3.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguien-  
te composición fué alimentado continuamente al fermentador:

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	335.0 miligramos por litro
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	277.5    "    "    "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	160.0    "    "    "
15	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.5    "    "    "
	$\text{CaCl}_2$	40.0    "    "    "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.55    "    "    "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.55    "    "    "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.75    "    "    "
20	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.32    "    "    "
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.023    "    "    "
	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (36 N)	0.125 mililitros por litro
	Agua desmineralizada para	1000 mililitros
	pH	2.6

25            El fermentador fué mantenido a una temperatura de 45°C,  
a una proporción de dilución de 0.18 y a una velocidad de -  
impulsión de 15000 revoluciones por minuto. Una proporción



de fluido de gas de 30 volúmenes por volumen hora fué aplicada al fermentador. EL gas consistía de 20 por ciento por volumen de metano y 80 por ciento por volumen de aire.

5 Etapa C: Estado de operación constante usando hidróxido amónico como la fuente de nitrógeno con un independiente control del pH usando hidróxido sódico.

10 El pH controlado a 6.6 por la adición de 1.0 N hidróxido sódico desde un valorador automático en rendimiento a los medios pH en el caldo. Una solución 1.1 N hidróxido amónico fué  
15 adicionada por una bomba, la proporción de suministro ajustada de acuerdo a la estimada concentración de ion amonio en el caldo. La concentración ion amonio fué estimada por un método calorimétrico referido en la etapa B del Ejemplo 5. La fermentación fué operada durante un período mínimo de 7 días. La densidad celular bajo estas condiciones fué aproximadamente 5.0 gramos por litro dando una proporción de producción bacteriana celular de aproximadamente 0.9 gramos (peso seco) por litro hora.

Los siguientes resultados son característicos de aquellos obtenidos durante el experimento.

20

Tiempo (horas)	Medio de entrada (ml/h)	Absorción de 1.0 N NaOH por valoración (ml/h)	Densidad celular	Exceso de concentración de $\text{NH}_4^+$ en el caldo (mg/litro)
0	500	3.0	4.9	15.0
12	"	3.0	5.0	8.0
24	"	2.9	5.0	7.5
36	"	3.0	4.9	10.0
25 48	"	3.1	4.9	12.5
60	"	2.9	5.0	15.0
72	"	3.0	5.0	17.5
84	"	3.0	4.8	16.0
96	"	2.9	5.0	15.0



Los resultados de arriba demuestran que por abastecimiento de hidróxido amónico por una bomba en réplica al exceso de concentración de ion  $\text{NH}_4^+$  en el caldo, un estado continuo de fermentación puede ser operado.

5 La neutralización por hidróxido sódico mantiene un constante pH en el caldo de fermentación.

### EJEMPLO 7

Etapa B: - Etapa intermedia para producir la densidad celular.

10 5.0 litros de caldo de cultivo conteniendo la población bacterial que utiliza metano obtenida de acuerdo con la etapa A del Ejemplo 1, fueron usados para iniciar una operación continua en fermentador agitado teniendo un volumen de trabajo de 5.0 litros. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué alimentado continuamente al fermentador:

15	$\text{H}_3\text{PO}_4$	1098.0 miligramos por litro
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	825.0 " " "
	KCl	275.0 " " "
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	210.0 " " "
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	54.4 " " "
20	$\text{CaCl}_2$	75.0 " " "
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20.6 " " "
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.9 " " "
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.8 " " "
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5 " " "
25	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 " " "
	Agua desmineralizada para	1000 mililitros
	pH	2.25



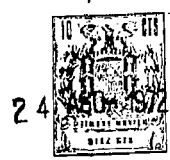
El fermentador fué operado a una temperatura de 45°C, a una proporción de dilución de  $0.18 \text{ h}^{-1}$  y a una velocidad de impulsión de 3000 revoluciones por minuto. Una proporción de fluido de gas de 66 volúmenes por volumen hora fué aplicada a la entrada del fermentador. El gas consistía de 18.2 por ciento por volumen de metano y 81.8 por ciento por volumen de aire.

Una solución 1.1 N de hidróxido amónico fué adicionada al caldo fermentador con una bomba, el suministro de entrada siendo regulado de acuerdo con la concentración de ion amonio en el caldo usando la estimación técnica dada en el Ejemplo 5. El pH fué controlado a 6.2 por la adición de 1.0 N NaOH en solución desde un valorador automático en réplica a los cambios pH en el caldo.

Etapas C: Estado de operación constante usando hidróxido amónico como la fuente de nitrógeno con un independiente control usando hidróxido sódico.

La densidad celular bajo estas condiciones establecida a aproximadamente 1.4 gramos ( peso seco ) por litro. La fermentación fué operada bajo estado de condiciones constantes durante un período mínimo de 7 días. La proporción de producción bacteriana fué aproximadamente 2.5 gramos ( peso seco ) por litro hora.

Los siguientes resultados son característicos de aquellos obtenidos durante el experimento.



	Tiempo (horas)	Medio de entrada	Absorción de 1.0 N NaOH por valoración (ml/h)	Densidad celular (g/l)	Exceso de concentración de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en el caldo (mg/litro)
	0	815	5.3	13.9	15.0
	12	"	5.5	14.0	12.5
	24	"	5.7	14.3	10.0
5	36	"	5.8	14.4	9.5
	48	"	5.5	14.0	10.0
	60	"	5.7	14.1	8.0
	72	"	5.1	14.3	7.5
	84	"	5.6	14.0	7.8
10	96	"	5.7	14.4	9.5

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:

1.- Un procedimiento continuo para convertir metano en materiales proteínicos, el cual comprende el cultivo de microorganismos que utilizan metano continuamente bajo condiciones de estado constantes a una proporción de producción de a lo menos 0.81 gramos (peso seco) de microorganismos por litro hora en un caldo acuoso que contiene sales nutrientes e iones amonio, en presencia de metano y un gas que contiene oxígeno libre, en el que el pH del caldo es mantenido en el orden de 4.5 a 8.0 y la concentración de ion amonio es mantenida en el orden de 2 a 100 miligramos por litro.

2.- Un procedimiento tal como el especificado el 1, en el que el pH del medio nutriente acuoso adicionado al caldo es inferior que 7,5 y tiene un valor suficientemente más bajo que el pH del caldo de modo que la concentración de ion hidrógeno resultante en el caldo es tal que la cantidad de iones amonio requerida en cualquier momento dado para controlar el pH del caldo está en el orden de 2 a 100 miligramos por litro.

3.- Un procedimiento tal como el especificado en 2, en el que el pH del medio acuoso está en el orden de 2.0 a 3.5.

4.- Un procedimiento tal como el especificado en 1, en el que el pH del caldo es mantenido en el orden de 4,5 a 8.0 por adición de un ácido o un álcali que no es amoniaco o hidróxido amónico y la concentración de ion amonio es mantenida en el orden de 2 a 100 miligramos por litro en rendimiento - con medios para estimar la concentración de ion amonio en el caldo.

5.- Un procedimiento tal como el especificado en 4, en el que el álcali que no es amoniaco es un hidróxido de un metal alcalino, preferiblemente hidróxido sódico.

6.- Un procedimiento tal como el especificado en una - de las reivindicaciones 4 o 5, en el que los medios para estimar la concentración de iones amonio en el caldo es una investigación en combinación con un registrador de pH.

7.- Un procedimiento tal como el especificado en una - cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones amonio son establecidos por adición de amoniaco o de hidróxido amónico al caldo.



8.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de ion amonio en el caldo es mantenida en el orden de 2 a 50 miligramos por litro.

5 9.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de ion amonio en el caldo es mantenida en el orden de 10 a 30 miligramos por litro.

10 10.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo que utiliza metano es parte de una población microbial obtenida por un enriquecimiento técnico.

15 11.- Un procedimiento, tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en el que el microorganismo que utiliza metano es Methylococcus capsulatus.

12.- Un procedimiento tal como el especificado en 11, en el que la temperatura de operación está en el orden de aproximadamente 42 a aproximadamente 48°C.

20 13.- "Un procedimiento continuo para convertir metano en materiales proteínicos".

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

Barcelona, 24 de Agosto de 1.972.