

416200

FC 11-11-75

C12D/A23J



PATENTE DE INVENCION

por 20 años

por "Procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en sustancias proteínicas" -

a favor de THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, de nacionalidad británica, domiciliada en Britannic House, Moor Lane-LONDON, E.C.2 (Inglaterra).-

- - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a mejoras introducidas en y con relación a procedimientos de fermentación continuos para convertir hidrocarburos en sustancias proteínicas, opcionalmente con la modificación de mezclas de hidrocarburo, por separación de hidrocarburos de cadena recta, en el cual se recicla por lo menos parte de la fase acuosa del caldo de fermentación.

La patente inglesa nº 1.021.697 describe un proceso continuo para la fabricación de levaduras a partir de hidrocarburos, opcionalmente con la separación de hidrocarburos de cadena recta a partir de fracciones de petróleo, donde se recicla parte de la fase acuosa del caldo de fermentación. La patente describe un procedimiento que comprende las etapas de cultivar en forma continua una levadura que utiliza hidrocarburo de cadena recta en un

6
416200



- 2 -

caldo que comprende una fracción de petróleo que contiene hidrocarburos de cadena recta que tienen por lo menos 10 átomos de carbono por molécula, un medio nutritivo acuoso y un gas que contiene oxígeno libre, separando continuamente del caldo una fracción rica en levadura y una fracción que comprende una mayor parte de la fase acuosa presente en el caldo y, después de ello reciclar la fase acuosa continuamente o de manera discontinua para formar parte del caldo de fermentación. Se describe la posibilidad de separar del caldo aproximadamente un 96% en peso de la fase acuosa. Sin embargo, de acuerdo con la patente, debido a la presencia de iones nutritivos en la fase acuosa, se podría reciclar un máximo de aproximadamente un 75% por volumen de la fase acuosa recuperada.

Medio nutriente fresco y cantidades "complementarias" de sales nutritivas pueden ser adicionadas ya directamente al caldo o a la fase acuosa antes de ser reciclada al caldo.

Ahora ha sido ideado un proceso de fermentación continua mejorado para la producción de microorganismos que utilizan hidrocarburos como el substrato de carbono en el cual se recicla la fase acuosa. El proceso proporciona un régimen de producción aumentado de microorganismo y permite reciclar substancialmente toda la fase acuosa que se puede separar del caldo.

En consecuencia, la presente invención es un procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en sustancias proteínicas que comprende cultivar continuamente un microorganismo que utiliza hidrocarburo de cadena recta en una primaria etapa de fermentación en un caldo que comprende una fracción de petróleo que está constituida por o contiene un hidrocarburo de cadena recta que tiene por lo menos 10 átomos de carbono por molécula, un medio nutritivo acuoso y un gas que contiene oxígeno libre, recuperar con-

417200



- 3 -

tínuamente caldo procedente de la etapa primaria de fermentación, separando el caldo en una fracción rica en microorganismo y una fracción que comprende esencialmente fase acuosa, tratar la fracción de fase acuosa en una etapa de fermentación secundaria con un
5 microorganismo que utiliza ácido carboxílico, o una mezcla de dichos microorganismos, recuperar la fase acuosa tratada de la etapa secundaria de fermentación y reciclar la fase acuosa tratada ya sea continúa o intermitentemente, para formar parte de la etapa primaria de fermentación del caldo.

10 Las condiciones bajo las cuales se realiza la etapa secundaria de fermentación son preferiblemente aeróbicas, empleando regímenes de aireación moderados, por ejemplo del orden de 10 a 50 volúmenes/volumen por hora. La temperatura puede estar comprendida en el orden de 20°C a 38°C y es preferiblemente de alrededor de 30°C.
15 El pH puede quedar comprendido en el orden de 4 a 7 y es, de preferencia, de aproximadamente 5. La fermentación secundaria se puede llevar a cabo aséptica o no aséptica y, de preferencia, de manera continua. Cuando la fermentación se lleva a cabo no asépticamente bajo las condiciones selectivas precedentes se produce naturalmente
20 un cultivo mezclado de bacterias desarrolladas utilizando ácido carboxílico. Si se desea, la etapa secundaria de fermentación puede ser llevada a cabo asépticamente, empleando un cultivo iniciador de microorganismos que utilicen ácido carboxílico obtenidos de la manera expuesta. Los microorganismos son usualmente bacterias que
25 utilizan ácido carboxílico pertenecientes al género Alcaligenes, Pseudomonas, Achromobacter y Moraxella.

Las condiciones más adecuadas para efectuar la etapa secundaria de fermentación se ajustan de manera de separar una proporción

6
418200



- 4 -

mayor y preferiblemente sustancialmente toda de los ácidos carboxílicos presentes en la fase acuosa.

La etapa secundaria de fermentación se puede ser efectuada en un recipiente de fermentación tipo cuba convencional, por ejemplo, un fermentador por vía aérea. En su lugar, se puede utilizar un fermentador de filtro de escurrimiento o un fermentador de sedimento activado. Los fermentadores de estos dos últimos tipos son ya bien conocidos. Los fermentadores de filtro de escurrimiento comprenden usualmente una torre que contiene un material de compacción, tal como, por ejemplo, "anillos Raschig" a través de o sobre el cual fluye hacia abajo caldo que contiene el microorganismo de cultivo bajo la influencia de la gravedad y asciende cuando se aplica una contracorriente de aire. Los fermentadores de sedimento activado comprenden comúnmente un recipiente fermentador horizontal, medios para airear el recipiente, medios tales como por ejemplo un decantador para separar en una fracción de fase sustancialmente acuosa el producto que fluye y una fracción de sedimento rica en el microorganismo de cultivo del fermentador de sedimento y medios para reciclar la fracción de sedimento en el recipiente de fermentación.

En la realización del proceso, la fase acuosa se puede separar del caldo recuperado de la etapa primaria de fermentación por dichos medios de decantación, centrifugación o filtración. Por centrifugación es posible separar hasta aproximadamente un 95% por volumen de la fase acuosa total presente en el caldo. Sin embargo, es más usual separar entre un 75 a un 85% por de la fase acuosa presente en el caldo.

Si se desea, se puede reciclar toda la fase acuosa a la etapa primaria de fermentación después de tratamiento en la etapa

417200



- 5 -

secundaria de fermentación. En la práctica la cantidad mínima de fase acuosa a reciclar debe ser por lo menos un 50% del volumen total de fase acuosa que estaba presente en la etapa primaria de fermentación del caldo.

5 Por otra parte, la máxima cantidad de fase acuosa que es posible prácticamente reciclar es aproximadamente de un 95% del total de la fase acuosa presente en la etapa primaria de fermentación del caldo.

10 La presencia en la fase acuosa tratada de microorganismos de etapa secundaria de fermentación viables, es decir, cultivo microbiano que utiliza ácido carboxílico no es deseable, puesto que puede reducir el régimen de crecimiento del microorganismo de cultivo de la etapa primaria de fermentación.

15 En consecuencia, es conveniente someter la fase acuosa tratada a una técnica por medio de la cual el microorganismo de cultivo de la etapa secundaria de fermentación es inactivado o matado antes de reciclar la fase acuosa tratada en la etapa primaria de fermentación. En una variante, o bien adicionalmente, la fase acuosa tratada puede ser sometida a una técnica para
20 separar de la misma antes de ser reciclada el microorganismo de cultivo de la etapa secundaria. La fase acuosa puede ser sometida convenientemente a una etapa de tratamiento térmico para inactivar o matar el microorganismo de cultivo de la etapa secundaria de fermentación. La temperatura de tratamiento puede ser
25 del orden de 80 a 130°C y el tiempo de tratamiento puede ser del orden de 0,5 a 15 minutos.

Un método conveniente para separar el microorganismo de cultivo de la etapa secundaria consiste en someter la fase tratada

416200



- 6 -

acuosa a una etapa de decantación en la que es posible que la fase tratada acuosa se separe bajo la influencia de la gravedad en una fracción de sedimento inferior que comprende principalmente microorganismo de cultivo de la etapa secundaria y una fracción de fase acuosa superior que está substancialmente libre de microorganismo de cultivo de la etapa secundaria. Otras técnicas para separar de la fase tratada acuosa el microorganismo de la etapa secundaria son centrifugación o filtración.

En la práctica, solamente es reciclada parte de la fase acuosa tratada debido a pérdidas técnicas durante el tratamiento y es conveniente añadir elementos nutritivos "complementarios" como una solución acuosa. En la práctica, se desestima aproximadamente un 10% por volumen de la fase acuosa tratada y el volumen obtenido con medio nutritivo acuoso fresco se puede añadir directamente al caldo de la etapa primaria de fermentación o a la fase acuosa tratada antes de ser agregada al caldo.

La concentración de elementos nutritivos en la etapa primaria de fermentación del caldo se mantiene constante por adición a la etapa primaria del caldo elementos nutritivos "complementarios" (es decir, sales nutritivas y otras substancias esenciales requeridas para el crecimiento del microorganismo). Los elementos nutritivos "complementarios" se pueden agregar preferiblemente como una solución, ya sea a la fase acuosa tratada o directamente estos a la etapa primaria de fermentación del caldo. La concentración de estos elementos nutritivos "complementarios" debe ser tal que asegure que se mantiene constante toda la cantidad de nutrientes suministrados a la etapa



primaria de fermentación del caldo.

El pH más adecuado de la fase acuosa reciclada se debe ajustar de modo que se corresponda con el pH de la etapa primaria de fermentación del caldo.

- 5 La etapa de fermentación se puede llevar a cabo empleando técnicas de realización conocidas. En las patentes inglesas números 1.017.584, 1.021.697 y 1.208.273 se describen las técnicas de puesta en práctica más apropiadas.

10 La invención se ilustra, aunque no queda limitada, con los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

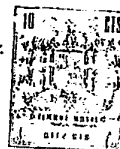
A. Inicio de etapa de fermentación secundaria

Una levadura *Candida tropicalis* CBS número 6373 consumiendo hidrocarburo de cadena recta fué cultivada continuamente y no
15 asépticamente en una etapa primaria de fermentación en un fermentador con inyección de aire (la agitación la proporciona el aire solo). El fermentador tiene un volumen de trabajo de un litro. El caldo de la etapa primaria de fermentación tenía la siguiente composición:

20 (1) Medio nutritivo acuoso

| | | |
|----|-----------------------|-----------------|
| | H_3PO_4 | 0,97 gramos |
| | KCl | 0,58 " |
| | $Mg(OH)_2$ | 0,039 " |
| | $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 0,012 " |
| 25 | $Fe SO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,031 " |
| | $Zn SO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,079 " |
| | $Cu SO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,0002 " |
| | Extracto de levadura | 0,015 " |
| | Agua complementaria | 1000 mililitros |

41⁶200



- 8 -

Fuente de nitrógeno

Iones de amonio suministrados como amoniaco.

(2) Substrato de carbono

Un gas-oil obtenido a partir de un aceite crudo del Irak que tenía las siguientes características:

| | | |
|---|------------------------|-----------------------|
| 5 | Gravedad específica | 0,876 |
| | Temperatura de fluidez | crítica + 7°C |
| | Régimen de ebullición | 300 a 380°C sobre TBP |

Se mezclaron 80 gramos de este gasoil con cada litro de medio nutritivo acuoso y la mezcla se suministró a la etapa primaria de fermentación del caldo con un régimen de 200 ml por hora. El régimen de dilución del fermentador fué de $0,2h^{-1}$.

Esta etapa primaria de fermentación fué mantenida a una temperatura de 30°C y a un pH de 4,2 mediante la adición de amoniaco líquido a conveniencia. La ventilación se realizó a un régimen de 400 volúmenes/volumen por hora.

Se hizo pasar caldo cultivado a partir de la etapa primaria de fermentación a un decantador donde pudo ser separado por gravedad según una fracción aireada superior que contenía el total de la levadura o hidrocarburo residual, y una fracción inferior constituida esencialmente por fase acuosa. El caldo se separó según aproximadamente un 75% por volumen de fase acuosa y 25% por volumen de fracción aireada que contenía levadura, o hidrocarburo residual. La fase acuosa así separada se hizo pasar en forma continua a un segundo recipiente fermentador que tenía un volumen de trabajo de 1 litro y en el que fué establecida una etapa secundaria de fermentación de la siguiente manera. El segundo fermentador era del tipo con inyección de aire, en el cual el aire proporcionaba el único medio de agitación. La fermentación

417⁶200



- 9 -

fué mantenida no asépticamente a un régimen de dilución (D.) de $0,2^{-1}$. La temperatura fué mantenida a 30°C y el pH fué mantenido a 5,5 mediante la adición de amoniaco líquido. La aireación se efectuó a un régimen de 40 volúmenes/volumen por hora.

5 Dichas condiciones selectivas indujeron a la formación natural de un cultivo mezclado de bacterias que utiliza ácido carboxílico. La concentración de bacterias en el cultivo fué aproximadamente de 2×10^9 mililitros. El cultivo estaba constituido por especies de bacterias "gram negative" de los siguientes géneros:
10 Alcaligenes, Pseudomonas y Chromobacter. (según la obra "J.Gen. Microbiology" págs. 49 a 211. Edición 1967 de Thornley (M.J.)).

Las bacterias se encontraban principalmente en forma de precipitado en el fondo del fermentador con relativamente pocas bacterias en la fase acuosa.

15 Se continuó la fermentación hasta que se estableció funcionamiento en estado estacionario. Luego se recuperó fase acuosa del fermentador y se recicló al caldo de la etapa primaria de fermentación después de un tratamiento como sigue.

20 B. Reciclo de fase acuosa de etapa secundaria de fermentación de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Se recuperó en forma continua fase acuosa del segundo fermentador y se hizo pasar a un mezclador donde fueron agregados y disueltos elementos nutritivos "complementarios". El pH del caldo de etapa primaria de fermentación fué ajustado a 4,2.

25 Después se añadieron a 75 partes por volumen de la fase acuosa tratada 25 partes por volumen de una solución nutritiva "complementaria" acuosa que tenía la composición anteriormente descrita en el párrafo A, pero con un aumento de concen-

417200



- 10 -

tración cuádruple.

A continuación la mezcla fué reciclada a la etapa primaria de fermentación del caldo.

El régimen de producción de la etapa primaria de fermentación
5 fué de 14,3 gramos de levadura (peso seco) por litro de caldo.
El procedimiento se llevó a cabo en forma continua con reciclaje de aproximadamente un 75% por volumen de fase acuosa tratada recuperada de la etapa de fermentación del caldo durante 2700 horas y se terminó el ciclo.

10

EXPERIMENTO

Como comparación se efectuó la etapa primaria de fermentación, empleando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 pero sin reciclaje de fase acuosa consumida. El régimen de producción fué de 9,8 gramos por litro de levadura (peso seco).

15

Mediante realización continua sostenida de acuerdo con el procedimiento precedente fué posible obtener un incremento de aproximadamente un 40% en el régimen de producción de levadura.

Ejemplo 2

(A) Inicio de una etapa de fermentación secundaria.

20

Un linaje de la levadura *C. tropicalis* CBS número: 6373 consumiendo hidrocarburo de cadena recta, fué cultivado continuamente en forma no aséptica en una etapa primaria de fermentación en un fermentador de vórtice que tenía un volumen de trabajo de 25 litros. La etapa primaria de fermentación se llevó a cabo como
25 sigue:

410200



- 11 -

(1) Medio nutritivo acuoso.

| | | |
|----|-------------------------------|--|
| | P como $H_3 PO_4$ | 276 mg/l |
| | K como KCl | 360 " |
| | Mn como $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 5 " |
| 5 | Fe como $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1 " |
| | Cu como $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,2 " |
| | Zn como $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 22 " |
| | Mg como $Mg (OH)_2$ | 19,2 " |
| | Extracto de levadura | 15 " |
| 10 | Agua corriente complementaria | 1.000 ml |
| | Fuente de nitrógeno | Iones de amonio suministrados con amoniaco |

(2) Substrato de carbono

Un gasoil obtenido a partir de un aceite crudo de Irak que tenía las características siguientes:

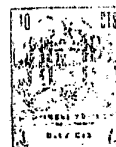
| | | |
|----|--------------------------------|-----------------------|
| 15 | Gravedad específica | 0.876 |
| | Temperatura de fluidez crítica | + 7°C |
| | Régimen de ebullición | 300 a 380°C sobre TBP |

Se mezclaron 90 gramos de este gasoil con 910 gramos de medio nutritivo acuoso y la mezcla fué alimentada al fermentador con un régimen de 6,25 l/hora. El régimen de dilución del fermentador fué de 0,25 h⁻¹.

La fermentación fué mantenida a una temperatura de 32°C, un pH de 4,4 y un régimen de ventilación de 60 volúmenes/volumen por hora. El caldo fué mantenido en agitación de remolino obtenida mediante un impulsor que giraba a una velocidad de 1200 r.p.m.

Se hizo pasar caldo cultivado de la etapa primaria de fermentación a un decantador continuo en el que por gravedad fué

6
417200



- 12 -

5 posible separarlo según una fracción aireada superior que contenía la totalidad de la levadura e hidrocarburo residual, y una fracción inferior constituida esencialmente sólo por fase acuosa. El caldo de la etapa primaria de fermentación se separó según aproximadamente un 75% por volumen de fase acuosa, (es decir, la fracción inferior.) El 25% restante por volumen, o sea, la fracción aireada superior, contenía alguna fase acuosa, pero estaba constituida esencialmente por levadura junto con hidrocarburo residual.

10 La fracción inferior (esencialmente fase acuosa) se hizo pasar en forma continua a un segundo fermentador en el que se estableció de la siguiente manera una fermentación secundaria. El fermentador tenía un volumen de trabajo de 25 litros y era del tipo de vórtice dotado de un impulsor para proporcionar agi-
15 tación en torbellino. La fracción separada, que contenía esencialmente levadura, se hizo pasar a un decantador estático, donde fué posible separar por gravedad otro 10% por volumen de fase acuosa. Este otro 10% por volumen de fase acuosa se hizo pasar al segundo fermentador para hacer un total de 85% por
20 volumen de fase acuosa en relación con el volumen total del caldo cultivado recuperado de la primera etapa de fermentación. La fase acuosa tenía un contenido de ácido carboxílico de 350 miligramos por litro.

25 El segundo fermentador fué puesto en funcionamiento en forma continua y no aséptica con un régimen de dilución de 0,2 horas⁻¹, un régimen de aireación de 10 volúmenes/volumen por hora y una temperatura de 30° a 32°C. El pH fué mantenido en aproximadamente 5 mediante la adición de amoníaco. La veloci-

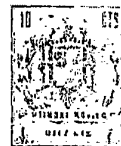


dad del impulsor fué ajustada para proporcionar agitación en torbellino. Después de 70 horas de funcionamiento continuo se desarrolló naturalmente un cultivo bacterial que tenía una densidad de aproximadamente 10^9 células por mililitro. El cultivo tenía la misma composición que la descrita en la etapa secundaria de fermentación del Ejemplo 1. Se prosiguió la fermentación hasta que se estableció funcionamiento continuo en estado estacionario. La fase acuosa recuperada de la etapa secundaria de fermentación así establecida tenía un contenido de ácido carboxílico de 20 miligramos por litro.

B. Reciclo de fase acuosa de etapa secundaria de fermentación de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

La fase acuosa recuperada de la etapa secundaria de fermentación se hizo pasar a un intercambiador de calor del tipo de placa donde fué sometida a una temperatura de 90°C durante un tiempo de 30 segundos. Este tratamiento mató o inactivó el cultivo bacterial de la etapa secundaria de fermentación. Luego la fase acuosa se pasó a una máquina centrífuga que fué accionada a una velocidad de 6.000 r.p.m. para separar de la fase acuosa bacterias de la etapa secundaria. La fracción que contenía las bacterias de la etapa secundaria comprendía aproximadamente alrededor de un 10% por volumen de la fase acuosa total recuperada de la etapa secundaria de fermentación secundaria. Esta fracción fué desestimada. La fracción restante constituida esencialmente por fase acuosa fué pasada a un mezclador donde se agregaron elementos nutritivos "complementarios", después de lo cual se trató y se hizo volver a la etapa primaria de fermentación de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La etapa

4.6200



- 14 -

primaria de fermentación se efectuó de manera continua durante 25 días en los cuales terminó. El régimen de producción fué de 13,2 gramos por litro de levadura (peso seco).

Experimento

A título de comparación, la etapa de fermentación principal se realizó, utilizando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2 sin reciclo de fase acuosa consumida. El régimen de producción fué de 9,8 gramos por litro de levadura (peso seco). Mediante funcionamiento continuo sostenido de acuerdo con el procedimiento precedente fué posible obtener un incremento de aproximadamente un 35% en el régimen de producción de levadura.

Ejemplo 3

Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, a excepción de que la fracción superior que contenía levadura fué separada en el decantador estático (es decir, un 15% por volumen del caldo cultivado procedente de la etapa primaria de fermentación, fué pasado a una máquina centrífuga donde se separó otro 10% por volumen de fase acuosa. Este otro 10% por volumen de fase acuosa se hizo pasar a la etapa secundaria de fermentación para hacer un total de un 95% por volumen del caldo de etapa primaria de fermentación pasado a la etapa secundaria de fermentación como fase acuosa. De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, se desestimó un 10% por volumen de la fase tratada acuosa recuperada de la etapa secundaria de fermentación. El 85% por volumen restante de fase tratada acuosa fué luego reciclado al caldo de etapa primaria de fermentación después de la adición de un 15% por volumen de una solución de elementos nutritivos "complementarios". El régimen de producción de la etapa primaria de fermentación fué de 13,2 gramos de levadura (peso seco)

417200



- 15 -

por litro de caldo de fermentación. La fermentación se llevó a cabo en forma continua durante 25 días después de lo cual finalizó el ciclo.

5 A título de comparación con el Experimento descrito en el Ejemplo 2, el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, en el que se recicló un total de un 85% por volumen del caldo de fermentación de la etapa primaria, produjo un incremento del 35% en cuanto al régimen de producción de levadura.

Ejemplo 4

10 Se llevó a cabo una fermentación, empleando el mismo procedimiento e iguales regímenes de flujo que se han descrito en el ejemplo 2, a excepción de que la etapa secundaria de fermentación se efectuó en un fermentador de sedimento activado y se omitió la etapa de tratamiento térmico para matar o inactivar las bacterias de segunda etapa existentes en la fase acuosa tratada.

15 El fermentador de sedimento activado estaba constituido por un recipiente dispuesto horizontalmente que por medio de una placa perforada vertical central se hallaba dividido en un primer y un segundo compartimientos, comprendiendo el fermentador medios para airear separadamente el primer y segundo compartimientos.
20

25 En la realización del procedimiento, fase acuosa decantada del caldo de etapa primaria de fermentación y que contenía 300 miligramos por mililitro de ácido carboxílico (un 85% por volumen del caldo de etapa de fermentación principal) se hizo pasar continuamente el fermentador de sedimento activado. Este fermentador fué mantenido a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) manteniéndose un pH natural comprendido en el orden de 4 a 5 y un régimen de aireación de 30 volúmenes/volu-

417200



- 16 -

men por hora en el primer compartimiento y de 10 volúmenes/volumen por hora en el segundo compartimiento. En tales condiciones se desarrolló naturalmente un cultivo bacterial que utilizaba ácido carboxílico. La composición del cultivo fué análoga a la del cultivo bacterial de la segunda etapa descrita en el Ejemplo 1. La corriente de producto procedente del fermentador de fango activado se hizo pasar a un decantador donde por gravedad fué posible separar de la fase acuosa bacterias de segunda etapa. Las bacterias así separadas en forma de sedimento fueron recuperadas y recicladas al fermentador de sedimento activado. La fracción de fase acuosa fué pasada a una máquina centrífuga accionada a una velocidad de 6000 r.p.m., por lo que se separó y desestimó una fracción que contenía las bacterias restantes y algo de fase acuosa, aproximadamente un 10% por volumen de la fracción pasada a la máquina centrífuga. El 75% por volumen restante de la fase acuosa (que comprendía 30 miligramos por litro de ácido carboxílico) fué mezclado con elementos nutritivos "complementarios" y después de ello se recicló a la etapa primaria de fermentación de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La etapa primaria de fermentación se llevó a cabo en forma continua durante 500 horas después de lo cual finalizó el ciclo. El régimen de producción de levadura fué de 11,9 gramos de levadura (peso seco) por litro.

A título de ejemplo, la etapa primaria de fermentación fué llevada a cabo sin recicló, empleando las mismas condiciones de funcionamiento que las descritas en relación con

417200



- 17 -

el Ejemplo 1. El régimen de producción fué de 9,6 gramos de levadura (peso seco) por litro.

5 Con la ejecución del procedimiento de acuerdo con la presente invención se obtuvo un aumento de un 25% en el régimen de producción de levadura.

Ejemplo 5

10 Una levadura utilizando hidrocarburo de cadena recta, "Candida tropicalis CBS nº 6373" fué cultivada en forma continua y no aséptica en una etapa primaria de fermentación en un fermentador elevador de aire poseedor de una capacidad de trabajo de $3,5 \times 10^3$ litros. La fermentación fué llevada a cabo empleando las mismas condiciones que las descritas para la etapa primaria de fermentación del Ejemplo 2.

15 Se hizo pasar caldo cultivado desde la etapa primaria de fermentación hasta un decantador continuo donde fué posible separarlo por gravedad según una fracción aireada superior que estaba constituida por la mayor parte de la levadura e hidrocarburo residual, y una fracción inferior constituida esencialmente sólo por fase acuosa. La fracción de fase acuosa así separada fué aproximadamente un 75% por volumen del volumen total del caldo recuperado
20 de la etapa primaria de fermentación. La fase acuosa tenía un contenido en ácido carboxílico de 300 miligramos por litro. La fracción de fase acuosa fué pasada a la parte superior de un fermentador de filtro de goteo en el que se llevó a cabo una etapa
25 secundaria de fermentación en presencia de un cultivo bacterial que utiliza ácido carboxílico. El cultivo bacterial tenía la misma actividad metabólica que el cultivo descrito en relación con el Ejemplo 2. El fermentador estaba constituido por un cilindro ver

6
417200



- 18 -

tical de una altura de cuatro metros y un diámetro de $1/16$ metros. El cilindro estaba lleno de 4000 litros de un polímero subdividido inerte. El área superficial presentada por la masa era de 126 metros²/metros³. El régimen de flujo de fracción de fase acuosa bajo la columna era de 11/metros² de llenado por hora. Así, el tiempo que permaneció la fase acuosa en la columna fué aproximadamente de unas 8 horas. La fermentación en la columna fué mantenida a temperatura ambiente, es decir, aproximadamente a 20°C. El pH fué el pH natural, es decir, aproximadamente de 4 a 5. La aireación se efectuó por medio del aire natural que fluyó hacia arriba en la columna.

La fase acuosa recuperada de la base de la columna se hizo pasar a un primer decantador donde por gravedad fué posible que las bacterias de segunda etapa se estableciesen en forma de sedimento. La fracción de fase acuosa decantada fué pasada a un segundo decantador donde fué posible establecer otra cantidad de bacterias en forma de sedimento. El sedimento bacterial decantado fué desestimado. El tiempo de permanencia de la fase acuosa en el primer y segundo decantadores fué de al menos 2 horas. Luego, la fase acuosa recuperada de los decantadores (que contenía 45 miligramos de ácido carboxílico por litro) fué pasada a una máquina centrífuga que se hizo funcionar a una velocidad de 6000 r.p.m. por lo cual se separó y desestimó un 10% por volumen. El 75% por volumen restante fué tratado con elementos nutritivos "complementarios" y retornado a la etapa primaria de fermentación de acuerdo con la técnica descrita en el Ejemplo 1. La etapa primaria de fermentación se efectuó en forma continua durante 6 meses con un régimen

6
417200



- 19 -

de producción de 11,5 gramos de levadura (peso seco) por litro, después de lo cual fué terminado el ciclo.

A título comparativo, se efectuó una etapa primaria de fermentación en las mismas condiciones que las descritas, pero sin
5 reciclado de la fase acuosa. El régimen de producción fué de 915 gramos por litro de levadura (peso seco) por litro. Así, mediante realización de acuerdo con la presente invención, se obtuvo una mejoría de aproximadamente un 20% de productividad de levadura (peso seco).

10

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:

15 1.- Procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en sustancias proteínicas, caracterizado por el hecho que consiste en las fases de: cultivar de forma continua un microorganismo que utiliza un hidrocarburo de cadena recta en una etapa primaria de fermentación en un caldo que comprende una fracción de petróleo que consiste de o contiene un hidrocarburo de cadena
20 recta que tiene por lo menos 10 átomos de carbono por molécula, un medio nutritivo acuoso y un gas que contiene oxígeno libre; recuperar de forma continua caldo de la etapa primaria de fermentación; separar el caldo en una fracción rica en microorganismos y una fracción que esencialmente comprende fase acuosa; tratar la
25 fracción fase acuosa en una etapa secundaria de fermentación con un microorganismo que utiliza ácido carboxílico, o una mezcla de dichos microorganismos; recuperar la fase acuosa tratada de la etapa secundaria de fermentación; y reciclación de la fase acuosa

15

417200

6



- 20 -

tratada, sea continuamente o intermitentemente para formar parte de la etapa primaria de fermentación del caldo.

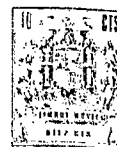
2.- Procedimiento tal como el especificado en 1, caracterizado por el hecho que la etapa secundaria de fermentación es
5 efectuada de forma continua y no aséptica y el microorganismo es un cultivo mezclado naturalmente producido de bacteria que utiliza ácido carboxílico.

3.- Procedimiento tal como el especificado en 1 o 2, caracterizado por el hecho que la fase acuosa tratada recuperada de
10 la etapa secundaria de fermentación es sometida a una técnica en la cual los microorganismos que utilizan ácido carboxílico presentes en ella son inactivados o muertos antes de reciclar la fase acuosa para formar parte de la etapa primaria de fermentación del caldo.

15 4.- Procedimiento tal como el especificado en 1 o 2, caracterizado por el hecho que la fase acuosa tratada recuperada de la etapa secundaria de fermentación es sometida a una técnica en la cual los microorganismos que utilizan ácido carboxílico presentes en ella son separados antes de reciclar la fase acuosa para formar parte de la etapa primaria de fermentación del
20 caldo.

5.- Procedimientos tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que la etapa secundaria de fermentación se efectúa en
25 un tipo de cuba fermentadora de extracción con inyección de aire comprimido.

6.- Procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el



hecho que la etapa secundaria de fermentación es efectuada en un fermentador de sedimento inactivado.

5 7.- Procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho que la etapa secundaria de fermentación es efectuada en un fermentador filtro percolador.

10 8.- Procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho que las etapas primaria y secundaria de fermentación son operadas en forma no aséptica.

15 9.- Procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho que una solución acuosa de elementos nutritivos "complementarios" es adicionada a la fase acuosa tratada antes de reciclo para formar parte de la etapa primaria de fermentación del caldo.

10.- "Procedimiento de fermentación para convertir hidrocarburos en sustancias proteínicas".

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

Barcelona, 9 de Junio de 1973.