



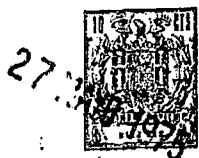
437954

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO CON SU APARATO CORRESPONDIENTE, PARA EL CULTIVO AEROBICO DE UN MICROORGANISMO", a favor de la firma suiza SOCIETE D'ASSISTANCE TECHNIQUE POUR PRODUITS NESTLE, S.A., residente en LAUSANNE (Suiza).

MEMORIA DESCRIPTIVA

- La presente invención se refiere al campo de la fermentación industrial para la producción de proteínas en gran escala. Tiene por objeto un procedimiento de cultivo aeróbico de un microorganismo en un medio nutritivo fluido, constando de por lo menos una fuente de carbono asimilable por este microorganismo, en el cual un caldo de cultivo compuesto por el medio nutritivo fluido y por una masa celular del microorganismo es hecha circular entre un nivel superior y un nivel inferior.
- 5.
10. El cultivo de gran rendimiento de microorganismos



- aerobios, especialmente en fracciones de petróleo o en substratos derivados del petróleo que no contienen más que muy poco oxígeno, exige muy grandes tasas de transferencia de oxígeno que prácticamente no pueden ser conseguidas a escala industrial con fermentadores de cuba con agitador o con fermentadores de torre de circulación conocidos. Por cultivo de gran rendimiento se entiende aquí un cultivo que permita obtener una producción del orden de 10-20 grs. de bacterias o de levaduras por litro de caldo de cultivo y por hora, lo cual, en el caso de substratos correspondientes a la fórmula C_nH_{2n+2} o $C_nH_{2n+1}OH$ por ejemplo, exige tasas de transferencia de oxígeno muy superiores a 500 mMoles de O_2 por litro y por hora. Grandes tasas de transferencia de oxígeno requieren grandes tasas de transferencia de anhídrido carbónico. Sin embargo, la amplitud de estas dos transferencias no debe ser causa de efectos de inhibición debidos a presiones parciales demasiado grandes de oxígeno y de anhídrido carbónico en el gas puesto en contacto con el caldo de cultivo o que circula en el mismo.
20. Aunque se puede aumentar la tasa de transferencia de oxígeno en un fermentador de cuba de agitación corriente utilizando aire enriquecido en oxígeno, un incremento de la evacuación del anhídrido carbónico obtenido durante la fermentación no puede ser obtenida más que aumentando notablemente la aireación. Sin embargo, no es posible aumentar indefinidamente el caudal de aire en un fermentador clásico de cuba de agitación sin rebasar muy pronto un límite más allá del cual el control de la espuma producida no puede ser ya garantizado. Bajo este aspecto se tiene una situación más ventajosa



- en el caso de un fermentador de torre de circulación equipado con un dispositivo de separación eficaz conectado en la parte alta de la torre, cuando el fluido desgasificado por lo menos parcialmente es reciclado por la parte baja de la torre. Pero si en este caso se desea aumentar la aireación para obtener la tasa de transferencia de oxígeno necesaria para un cultivo de gran rendimiento, se choca igualmente con un límite que aparece con la formación de vías preferentes de las burbujas de gas en un caldo insuficientemente agitado. El aumento de la velocidad relativa del gas con respecto al caldo de cultivo no se traduce por consiguiente por el efecto asperado de una mejora de la transferencia de oxígeno, sino por un efecto de inhibición debido a los gradientes así creados, saldándose finalmente por una pura pérdida de energía. Si bien es posible mejorar la situación previniendo obstáculos tales como deflectores sobre el recorrido del gas que asciende, esto sólo puede hacerse dentro de la medida en que estos obstáculos no provoquen a su vez la aparición de gradientes demasiado fuertes de presión parcial de oxígeno, los cuales crean una zona de presión inhibitoria en la parte inferior de la torre.

- El cultivo de gran rendimiento de microorganismos en substratos pobres en oxígeno plantea igualmente serios problemas de transferencia térmica. Se puede observar por ejemplo, que en un proceso en el cual el calor de fermentación es superior a 8000 kcal por kg de células producidas a una velocidad de producción de 15 grs por litro y hora, el aumento de la temperatura del medio asciende a 2°C/min si no es enfriado. Es pues esencial prever un sistema eficaz de



- refrigeración. Un dispositivo de refrigeración por intercambio térmico en el interior de la zona de fermentación no puede ser recomendado en el caso de un cultivo de gran rendimiento, en vista de los obstáculos indeseables que representarían las superficies de enfriamiento necesarias para mantener una temperatura de fermentación del orden de 30-40°C. Sería pues necesario prever un dispositivo de enfriamiento en el exterior de la zona de fermentación. Pero la conservación de débiles gradientes de temperatura por medio de un dispositivo de esta clase exige una gran velocidad de circulación del fluido. Sin embargo, esta velocidad no puede ser alcanzada en un fermentador de torre de circulación de los conocidos, sino es al precio de una disminución de la tasa de transferencia de oxígeno, lo cual va contra el objetivo perseguido de una tasa máxima de crecimiento.
- 5.
- 10.
- 15.

- Para este fin, el procedimiento según la invención está caracterizado por el hecho de que se somete el caldo, en una zona de fermentación que se extiende a lo largo de un ramal ascendente del circuito, a partir del nivel inferior, a la acción combinada de las fuerzas de fricción de burbujas de gas conteniendo oxígeno o bien de oxígeno, dejadas libres a presión en el caldo, de una fuerza mecánica que ejerce un empuje hacia arriba y de por lo menos un par de fuerzas mecánicas que trabajan en un plano horizontal. Se prefiere enfriar el caldo fuera de la zona de fermentación.
- 20.
- 25.

Resulta ventajoso proceder a un cultivo de modo continuo y se puede, a lo largo de un ramal descendente del circuito unida al ramal ascendente a los niveles superior



e inferior, desgasificar el caldo al menos parcialmente, enfriarlo y recuperar una fracción por lo menos de la masa celular que transporta, enriqueciendo simultáneamente en sustancias nutritivas el caldo reciclado en la zona de fermentación.

- 5.
- Entre las ventajas que asegura el procedimiento según la invención, se pueden hacer resaltar aquí la dispersión uniforme del gas en el fluido por medio de una tasa elevada de aireación, la homogeneidad del caldo de cultivo
10. en todo el largo de la zona de fermentación sin aparición de gradientes inhibitorios, la extensión máxima en el espacio disponible a este efecto y la eficacia de la transferencia de calor para una gran velocidad de circulación del fluido. El presente procedimiento permite igualmente disminuir
15. la energía total usada para la transferencia de una cantidad dada de oxígeno por unidad de volumen del fluido aireado, en relación con usada para la ejecución de procedimiento clásico. Se puede anotar finalmente la flexibilidad del presente procedimiento que permite adaptarlo a las particularidades
20. de los más variados cultivos, tanto en lo referente a la velocidad de crecimiento de los microorganismos como al calor desprendido durante la fermentación o al nivel de las presiones parciales de oxígeno o de anhídrido carbónico que deban ser respetados.
25. Se recomienda mantener en la cima de una zona de fermentación cuyo punto más alto esté por debajo del nivel superior una presión más alta que la presión predominante en el nivel superior. Esto puede reforzar las ventajas del procedimiento referentes a la flexibilidad de su eje-



5. cución y a la amplitud de la transferencia de oxígeno, ya que el trozo de circuito comprendido entre la cima de la zona de fermentación y la parte superior puede ser utilizado para distender los gases inyectados y liberados bajo presión, en tanto que de abajo arriba de la zona de fermentación la pérdida de presión puede ser idealmente limitada únicamente a la disminución de la altura de la columna de caldo.

10. La presente invención tiene igualmente por objeto un aparato destinado a la ejecución del procedimiento constituido por un conducto cerrado sobre sí mismo, compuesto de un ramal ascendente y de un ramal descendente comunicadas entre sí en un nivel superior y en un nivel inferior, caracterizado por el hecho de que el ramal ascendente comprende un recinto que delimita una zona de fermentación que se eleva a partir del nivel inferior y por el hecho de que el recinto encierra un dispositivo de inyección de gas en su parte inferior así como un dispositivo de propulsión mecánica de un caldo de cultivo y un dispositivo de agitación mecánica del caldo.

15. 20. Resulta ventajoso incorporar en el ramal descendente un dispositivo de desgasificación del caldo y un dispositivo de enfriamiento del caldo. Como el especialista habrá ya muy bien comprendido por la lectura de lo que antecede, la concepción en sí de este aparato lo destina al proceso continuo de grandes cantidades de caldo. Así es que el recinto de fermentación puede tener un volumen de más de 25. 50 m³, incluso de más de 100 m³, y que para un tiempo de estancia del caldo en el recinto del orden de un minuto, se pueden tener producciones del orden de 50 a 100 m³/min.



En estas condiciones, con el fin de limitar las dimensiones del dispositivo de refrigeración y las cantidades de fluido refrigerador necesarias, es recomendable prever un intercambiador térmico conectado entre un compresor y un condensador del fluido refrigerador, a saber, un intercambiador por evaporación. Con intercambiadores de esta clase, que pueden funcionar con caudales del orden de 10 a 20 toneladas por hora de un fluido de refrigeración tal como el freón, es posible reducir la extensión de las superficies de intercambio y por consiguiente disminuir las pérdidas de carga, aprovechando la diferencia de temperatura favorable para la transferencia térmica. En lo referente al dispositivo desgasificador, a saber, el dispositivo que permite la evacuación del nitrógeno del aire. en el caso de que se

5. inyecte aire en la parte baja del recinto de fermentación, el anhídrido carbónico desprendido durante la fermentación y el oxígeno que no hubiera sido utilizado, se puede prever la incorporación en la cima de la parte descendente de un separador por efecto superficial o de un hidrociclón.
- 10.
- 15.

20. Al ramal descendente se le puede conectar un dispositivo de recuperación de materia celular transportada por el caldo y se puede empalmar en la parte inferior del recinto de fermentación un conductor de alimentación de materiales de nutrición. El dispositivo de recuperación puede consistir en un conducto de desviación por el cual una parte del caldo desgasificado puede ser conducida a un dispositivo de separación de la masa celular del caldo, el caldo descargado de su masa celular pudiendo ser conducido nuevamente por un conducto de reciclado al ramal
- 25.



- descendente o al recinto de fermentación. A este propósito es razonable considerar que cuando la puesta en ejecución del presente procedimiento, la cantidad de caldo procesada por hora para separar del mismo la masa celular puede ser
5. del orden de la cantidad de caldo que pase por minuto en el recinto de fermentación. Las substancias nutritivas a inyectar por el conducto de alimentación en el recinto de fermentación para compensar gradualmente las sustancias consumidas por los microorganismos idóneos cultivados en
10. el recinto pueden ser un hidrocarburo, un alcohol o un azúcar como fuente de carbono y amoníaco o urea como fuente de nitrógeno, por ejemplo.

- El dispositivo mecánico de propulsión del caldo en el recinto de fermentación puede consistir de por lo menos
15. una hélice que gire en un plano horizontal y que sea susceptible de empujar el caldo hacia arriba, reforzando así el efecto ascensional del roce de las burbujas de aire o de oxígeno liberadas bajo presión en la parte inferior del recinto. El dispositivo de agitación mecánica del caldo
20. dentro del recinto puede componerse de una serie de juegos de paletas rotativas dispuestos a distancia uno de otro y uno encima de otro. Estos juegos pueden estar montados sobre un mismo eje rotativo vertical accionado por motor. Como sea que el efecto de agitación del caldo por estos
25. juegos de paletas tiene como consecuencia secundaria la formación de corrientes arremolinadas que oponen una cierta resistencia a la subida del caldo al recinto de fermentación, puede ser juzgado razonable dar a las aletas una inclinación con respecto al plano horizontal, o por lo menos



- a algunas de ellas, o darles una configuración tal que por lo menos uno de los juegos presente la forma de hélice y que sea susceptible de ejercer un empuje hacia arriba sobre el caldo. Está claro que es posible toda combinación de los dispositivos de propulsión y de agitación.
- 5.

- El recinto de fermentación no se extiende necesariamente por toda la altura comprendida entre el nivel superior y el nivel inferior, puede estrecharse debajo del nivel superior en un paso obligado que desemboque en un conducto que llegue al nivel superior y desemboque en el mismo sobre la parte alta del ramal descendente. De este modo es posible mantener en todo el nivel de un recinto cuya altura puede ser del orden de ocho a diez metros, una presión aproximadamente igual a la presión de inyección del aire o del oxígeno en la parte baja del recinto, menos la presión hidroestática de la columna de caldo aireado, comprendida entre la parte baja del recinto y el nivel que se considere. De este modo, si para obtener en el recinto de fermentación una tasa de transferencia bastante grande de oxígeno, muy superior a 500 mMoles O_2 , incluso superior a 900 mMoles O_2 por litro y hora, puede ser necesario tener una presión de por lo menos 3 a 3,5 atmósferas absolutas en un caldo que contenga en dispersión una cantidad de aire del orden de 40% en volumen, se puede disponer, a la salida del recinto de la energía en exceso, gas de alimentación para hacer funcionar como bomba de aire el conducto que conduce al nivel superior, donde puede reinar una presión próxima a la atmosférica. Esta separación del proceso de transferencia del oxígeno y del pro-
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



- ceso de expansión del gas de alimentación tiene como ventaja el vencer toda pérdida de carga, particularmente la debida al dispositivo de refrigeración, y de asegurar la circulación del caldo en el aparato, manteniendo simultáneamente en toda la zona de fermentación una presión suficientemente elevada y homogénea para obtener las tasas de transferencia de oxígeno deseadas. Es posible prever un paso obligado bajo forma de estrangulación, de diafragma o de una serie de deflectores que se recubran parcialmente el uno al otro a lo largo de un trayecto que conduzca desde la parte alta del recinto al conducto que conduce al nivel superior.
- 5.
- 10.

El plano adjunto representa, en corte vertical esquemático y a título de ejemplo, una forma de ejecución del aparato para la puesta en ejecución del procedimiento según la invención.

15.

Un recinto metálico 1 alargado verticalmente delimita una zona de fermentación 2. Un eje rotativo 3 atraviesa toda la zona de fermentación de abajo a arriba, o dicho de otro modo desde el nivel inferior 4 del aparato hasta la parte superior 5 del aparato. Un motor eléctrico 6 situado debajo del recinto acciona el eje 3. Juegos de paletas 7, 8, 9 y 10 están montados sobre el eje 3 con intervalos regulares. Cada juego, por ejemplo el juego 8, está compuesto de cuatro paletas planas 11. El plano de cada paleta está inclinado en el mismo sentido en relación con el plano vertical definido por su extremo libre y el eje 3, de modo que cada juego pueda funcionar a la vez como elemento de agitación del caldo de cultivo en fermentación en la zona 2 y como elemento de propulsión de este caldo hacia

20.

25.



arriba. El dispositivo de inyección de gas 12 montado en la parte inferior del recinto se compone de un juego de tubos horizontales perforados con pequeños orificios en la parte superior. Un conducto de alimentación de gas 13, cuyo caudal está dirigido por una válvula de alimentación de gas 14 está destinado a suministrar a los tubos 12 el gas que debe ser liberado a la presión deseada en la parte baja del recinto 1. Una válvula de compresión 15, conectada en la parte superior del recinto 1 une el extremo superior de la zona de fermentación 2 a un conducto de distensión 16 que conduce al nivel superior 17 del aparato. Esta válvula 15 constituye un paso obligado para el caldo aireado y debe servir así para impedir toda pérdida de presión que no sea debida a una disminución de la altura de la columna de caldo aireado en el interior del recinto. El conducto de distensión 16 constituye por consiguiente la parte superior del ramal ascendente del aparato. Su altura es tal que permite simultáneamente compensar las pérdidas de carga en el ramal descendente, vencer las resistencias que no hubieran sido totalmente compensadas en el recinto de fermentación por el efecto propulsor de los juegos de paletas en forma de hélice y asegurar la velocidad de circulación deseada del caldo en el circuito cerrado que constituyen el ramal ascendente y el ramal descendente del aparato, conectados entre sí en el nivel superior 17 y en el inferior 4. Como primer elemento del ramal descendente se tiene aquí un dispositivo de separación de gas 18, o eventualmente un ciclón. Un conducto de evacuación 28 del gas, ya sea liberado, ya sea no consumido durante la fermentación está empalmado sobre la parte superior del ciclón 18 y desemboca al aire libre



- por medio de una válvula de salida 19, destinada a dirigir los gradientes de presión en el aparato. La parte inferior del ciclón 18, destinada a recibir el caldo por lo menos parcialmente separado de los gases está conectada a un con-
5. ducto de retorno 20. El caldo presentará en el conducto 20 una densidad relativamente grande, que es garantía del funcionamiento como bomba de aire del conducto 16, en el cual el caldo aireado y fermentado circulará bajo la forma de una dispersión entregada a presión por la válvula de compresión
10. 15. Un conducto de recuperación de la materia celular transportada por el caldo parcialmente desgasificado, o conducto de desviación 21, está conectado con el conducto de retorno 20. El caudal del caldo a tratar para separar del mismo la materia celular está dirigido por una válvula de recuperación
15. 22 conectada en serie con el conducto 21. Este último conduce a un dispositivo de recuperación de materia celular, por ejemplo, una centrifugadora, no representada aquí. Un dispositivo de refrigeración 23, eventualmente un intercambiador de calor por evaporación, está conectado en serie con el con-
20. ducto de retorno 20, por lo que se refiere a la circulación del caldo, y en serie entre un compresor y un condensador no representados, en lo que se refiere a la circulación 24 del líquido refrigerante. Un último segmento del conducto de retorno 20 conduce desde el intercambiador 23 a la parte baja
25. del recinto de fermentación 1, pasando por una válvula 25 para el mando de la velocidad de circulación del caldo en el aparato. Se ve por último en 26 un conducto de alimentación de sustancias nutritivas empalmado en la parte inferior del recinto de fermentación. El conducto 26 pasa por una válvula



- 27 de mando del caudal de un fluido nutritivo suministrado por un dispositivo mezclador que no está representado. Un conducto de reciclado del caldo extraído por el conducto 21 y descargado a continuación de materia celular está conectado precisamente con este dispositivo mezclador de sustancias nutritivas. Así es como lo que podría ser nombrado el circuito cerrado secundario, en el cual circula la fracción de caldo de la cual puede ser retirada de modo continuo la materia celular, vuelve a cerrarse sobre el circuito cerrado en el cual circula la totalidad o casi del caldo.
- 5.
- 10.

= . =

REIVINDICACIONES

15. Describo el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 7249/74 del 28 de Mayo de 1974.

20. 1.- Procedimiento, con su aparato correspondiente para el cultivo aeróbico de un microorganismo, en un medio nutritivo, fluido constando por lo menos de una fuente de carbono asimilable por este microorganismo, en el cual un caldo de cultivo compuesto del medio nutritivo fluido y de una masa celular del microorganismo es hecho circular en circuito cerrado entre un nivel superior y un nivel inferior, caracterizado por el hecho de que se somete el caldo, en
25. una zona de fermentación que se extiende a lo largo de un ramal ascendente del circuito a partir del nivel inferior, a la acción combinada de las fuerzas de fricción de burbujas de gas conteniendo oxígeno o de oxígeno liberadas a presión

76



en el caldo, de una fuerza mecánica que ejerce un empuje hacia arriba y de por lo menos un par de fuerzas mecánicas que trabajan en un plano horizontal.

5. 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el caldo es enfriado fuera de la zona de fermentación.

10. 3.- Procedimiento, según la reivindicación 2, de cultivo continuo, caracterizado por el hecho que a lo largo de un ramal descendente del circuito unido al ramal ascendente en los niveles superior e inferior, se desgasifica por lo menos parcialmente el caldo, se le enfría y se recupera una fracción por lo menos de la masa celular que transporta, y que se le enriquece de sustancias nutritivas el caldo reciclado en la zona de fermentación.

15. 4.- Procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho que se mantiene en la cima de una zona de fermentación que tiene su parte superior por debajo del nivel superior una presión más alta que la presión que reina en el nivel superior.

20. 5.- Procedimiento, según la reivindicación 1, en donde el aparato, que está constituido por un conducto cerrado sobre sí mismo, compuesto de un ramal ascendente y de un ramal descendente que se comunican uno con otro en un nivel superior y en un nivel inferior, se caracteriza por el hecho
25. que el ramal ascendente tiene un recinto delimitando una zona de fermentación que se eleva a partir del nivel inferior, y por el hecho de que el recinto encierra un dispositivo de inyección de gas en su parte inferior, así como un dispositivo de propulsión mecánica para un caldo de cultivo y un



dispositivo de agitación mecánica del caldo.

5. 6.- Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho que el ramal descendente tiene un dispositivo de desgasificación del caldo y un dispositivo de refrigeración del caldo.

7.- Procedimiento, según la reivindicación 6, caracterizado por el hecho que el dispositivo de refrigeración es un intercambiador térmico conectado entre un compresor y un condensador de líquido refrigerante.

10. 8.- Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de contener un dispositivo de recuperación de materia celular unido al ramal descendente y un conducto de alimentación de sustancias nutritivas conectada en la parte inferior del recinto de fermentación.

15. 9.- Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho que el dispositivo de propulsión mecánica sea una hélice por lo menos.

20. 10.- Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho que el dispositivo de agitación mecánica se compone de una serie de juegos de paletas rotativas dispuestos a distancia uno de otro y uno encima de otro.

11.- Procedimiento, según las reivindicaciones 9 y 10, caracterizado por el hecho que por lo menos uno de los juegos de paletas de agitación tenga la forma de hélice.

25. 12.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho que el recinto se estrecha debajo del nivel superior sobre un paso obligado por el cual el espacio que delimita comunica con un conducto que va a parar al nivel superior.



13.- Procedimiento, según la reivindicación 12, caracterizado por el hecho que el paso obligado está delimitado por una estrangulación.

5. 14.- Procedimiento, según la reivindicación 12, caracterizado por el hecho que el paso obligado está delimitado por un diafragma.

10. 15.- Procedimiento, según la reivindicación 12, caracterizado por el hecho que el pasombligado está delimitado por una sucesión de deflectores que se cubren parcialmente uno a otro.

16.- Procedimiento con su aparato correspondiente, para el cultivo aerobico de un microorganismo.

15. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 16 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras y acompañados de los dibujos reglamentarios.

Madrid, a 27 MAYO 1975

P.a.

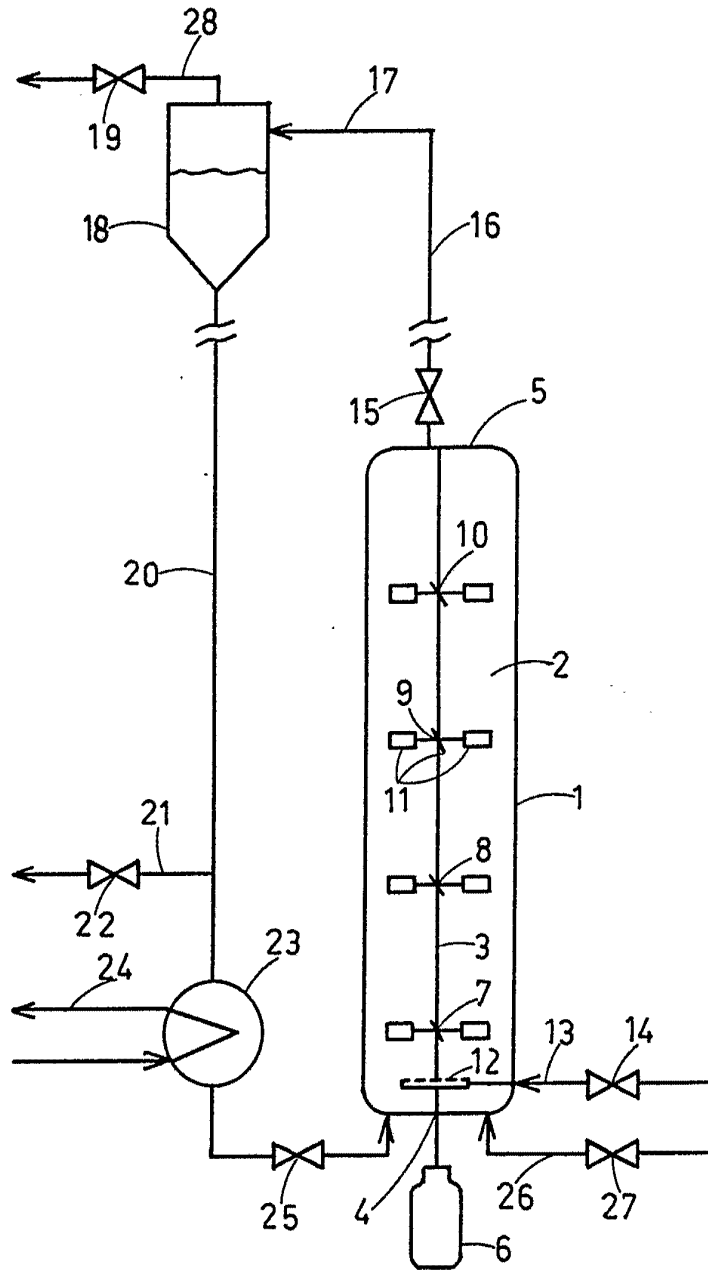
JAIME ISERN

p. p.

Firmado: JOSÉ F. NIETO

mpc.

437954



Madrid, a 27 Mayo 1975
p.o. JAIME ISERN
D.P.