

450991
16-8-1976

606.957

22 Agosto 1975

Estados Unidos de
América

Int. Cl. ² : C12D

"Un método para recuperación de zearalenona".

IMC CHEMICAL GROUP, INC.

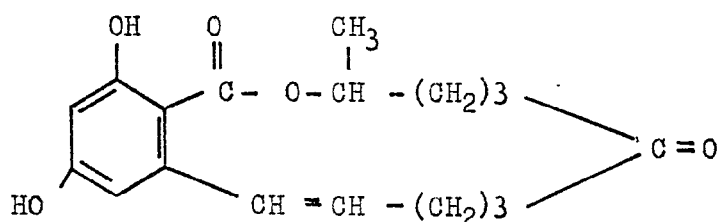
245 Park Avenue, NEW YORK, New York 10017, (USA)

Vernon V. Young, John Stanley Kosewing y Frederick William Schmitz.

IMC CHEMICAL GROUP, INC.

CARLOS BONET SOLER

La presente invención se refiere a un método para la recuperación de zearalenona, a partir de una mezcla acuosa formada por una fase acuosa y una fase sólida, conteniendo la fase sólida, zearalenona y otras partículas sólidas no disueltas. La zearalenona puede quedar representada por la siguiente fórmula química estructural:



La zearalenona es un producto de fermentación natural, que puede conseguirse por medio del cultivo de una cepa del microorganismo Gibberella zeae productora de zearalenona, en un medio nutritivo acuoso apropiado.

Métodos empleados en la producción de zearalenona, por fermentación de Gibberella zeae en un medio nutritivo acuoso, quedan descritos por ejemplo, por Andrews, F.N. y colaboradores, Patente U.S. 3.196.019 concedida el 20 de Julio de 1965, y por Keith, C.L., Patente U.S. 3.661.712 concedida el 9 de Mayo de 1972, aquí incorporadas a fines de referencia.

El proceso fermentativo descrito por Andrews y colaboradores, utiliza un substrato poroso sólido para el medio nutritivo. El descrito por Keith, incluye un cultivo en inmersión de una cepa de Gibberella zeae sumergible productora de zearalenona, en un medio nutritivo en fase líquida aireado, por ejemplo, una solución acuosa de una fuente de carbohidratos, una fuente de nitrógeno orgánico o inorgánico, minerales y otros nutrientes.

Al medio fermentado que contiene zearalenona, agua y sólidos no disueltos, tales como micelios de Gibberella zeae,

le conocemos con el nombre de licor de fermentación. La zearalenona es substancialmente insoluble en el licor de fermentación y, se necesita un método de recuperación de la zearalenona a partir del licor de fermentación, con un alto rendimiento y gran pureza.

Según la presente invención, se muestra un método para la recuperación de la zearalenona a partir de una mezcla acuosa formada por fase sólida y fase líquida, conteniendo la fase sólida zearalenona y otros sólidos no disueltos, que abarca:

a) poner en contacto la zearalenona con una mezcla zearalenona-selectiva formada esencialmente por un disolvente orgánico acuomiscible y agua en cantidades suficientes para disolver selectivamente y hacer pasar la zearalenona desde la fase sólida a la fase acuosa, proporcionando una solución de zearalenona apta para ser bombeada.

b) extraer los sólidos no disueltos de la solución de zearalenona, a una temperatura lo suficientemente alta como para mantener la zearalenona en solución y lo suficientemente baja como para que los sólidos no se disuelvan, formando así una solución de zearalenona clarificada.

c) aumentar la proporción entre agua y disolvente orgánico acuomiscible, en la solución de zearalenona clarificada, para hacer precipitar aquella.

d) separar la zearalenona precipitada de sus aguas madres a una temperatura en la que aquella sea substancialmente insoluble en sus aguas madres.

El método de la presente invención es muy útil para la recuperación de zearalenona a partir de una mezcla acuosa, ofreciendo particulares ventajas en la recuperación de la zearalenona a partir de un licor de fermentación. El método puede emplearse para la recuperación de zearalenona a

partir de un licor de fermentación líquido resultante de una fermentación en inmersión, tal como describió Keith, C.L., o a partir de un sustrato poroso sólido, tal como lo hizo Andrews, F.N.

- 5 Utilizando el método de ésta invención, la zearalenona se pone en contacto con una mezcla zearalenona-selectiva, formada en esencia por agua y un disolvente orgánico acuomiscible (al que en lo sucesivo nos referiremos con el nombre de mezcla disolvente acuosa). La cantidad de mezcla disolvente acuosa utilizada es suficiente para disolver selectivamente y transferir substancialmente toda la zearalenona de la fase sólida a una fase acuosa y, variará con la cantidad de agua de la mezcla disolvente acuosa, el disolvente acuomiscible utilizado, la cantidad de zearalenona a recuperar, la temperatura, etc. La concentración de disolvente orgánico acuomiscible de la fase disolvente acuosa, variará según el disolvente que se utilice. Una de las razones para el empleo de una mezcla de agua y disolvente orgánico acuomiscible, en lugar de un disolvente puro, es que se requiere solo una cantidad mínima de disolvente orgánico, para dar lugar a una mezcla de suspensión que se pueda usar adecuadamente y sin peligros en los equipos de manipulación de líquidos, es decir, una suspensión bombeable.
- 20
- 25 Para determinar la concentración mínima de disolvente orgánico acuomiscible que ha de utilizarse en una mezcla disolvente acuosa, hay que calcular primero la cantidad total de líquido necesario para proporcionar una mezcla de suspensión con la debida consistencia. Con base en ésta cantidad total de mezcla disolvente acuosa a utilizar, la proporción entre agua y disolvente orgánico acuomiscible, será tal, que aquella disuelva la zearalenona presente. Se
- 30

puede utilizar cualquier disolvente orgánico acuomiscible que nos proporcione una mezcla disolvente acuosa zearalenona-selectiva, pero los más ventajosos son los compuestos alifáticos poseedores de oxígeno, tales como la acetona y los alcoholes con 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo metanol, etanol, propanol y butanol. La acetona es la preferida en el método de la presente invención, a causa de sus propiedades disolventes; sin embargo, el metanol puede ser el disolvente comercialmente preferido, ya que por lo general es bastante más barato que la acetona y posee una temperatura de inflamación inferior a la de aquella, lo que da una mayor seguridad.

El volumen de mezcla disolvente acuosa a utilizar, ha de ser una cantidad suficiente para conseguir mezclas de suspensión con un 10 a un 60 % en peso, de sólidos, preferiblemente entre el 30 y el 50 %. Tales mezclas de suspensión serán líquidos bombeables que puedan utilizarse en el equipo normal de manipulación de líquidos. Un licor de fermentación resultante de una fermentación en inmersión, tiene por lo general una consistencia adecuada para su utilización en el equipo de manipulación de líquidos, por lo que la mezcla disolvente acuosa puede formarse in situ, añadiendo la cantidad suficiente de disolvente acuomiscible al licor de fermentación, para luego restituir la zearalenona soluble en él.

A veces se desea separar los sólidos del licor de fermentación líquido, antes de poner en contacto la zearalenona con la mezcla zearalenona-selectiva, por ejemplo, por medio de la filtración o la centrifugación. La separación puede efectuarse para extraer las impurezas disueltas, antes de la recuperación y, para permitir la utilización de volúmenes más pequeños de mezcla disolvente acuosa. Cuando se practica

tal separación, los sólidos (a los que nos referiremos con el nombre de torta de filtración) que contienen la zearalenona, se mezclan en suspensión con la mezcla disolvente acuosa. El volumen de mezcla disolvente acuosa será el suficiente para proporcionar una mezcla de suspensión substancialmente líquida, con el contenido de sólidos antes citado y lo más indicado y ventajoso es que sea similar al volumen del licor de fermentación a partir del cual se obtuvieron los citados sólidos. Cuando se utiliza el método de ésta invención, para la recuperación de zearalenona a partir de un substrato poroso sólido, la disolución de zearalenona puede realizarse de la misma manera que en el caso de la recuperación a partir de una torta de filtración de un licor de fermentación líquido.

La mezcla disolvente acuosa más indicada es la que lleva un 40 a un 60 % en volumen, de acetona; sin embargo, otras mezclas acuosas de acetona conteniendo un 25 a un 100 % en volumen, de acetona, resultan también satisfactorias. El metanol y el etanol acuosos son más eficaces a concentraciones de alrededor del 50 al 75 % en volumen; sin embargo, cifras entre el 40 y el 100 % en volumen, son también eficaces. El propanol y el butanol son efectivos a concentraciones de entre el 75 y el 100 % en volumen, de preferencia entre el 90 y el 100 %.

La zearalenona de la mezcla acuosa se pone en contacto con la mezcla disolvente acuosa, durante el tiempo suficiente para disolver selectivamente toda la zearalenona presente, formando así una solución de zearalenona. El periodo de tiempo requerido, dependerá de la mezcla disolvente acuosa utilizada y de la temperatura de dicha mezcla, etc., pero por lo general serán suficientes de 10 minutos a 5 horas, preferiblemente entre 30 minutos y 2 horas, para conseguir

la disolución de la zeaxalenona. Una vez disuelta ésta, los sólidos no disueltos son extraídos de la solución de zeaxalenona, por ejemplo por filtración o por centrifugación, dejando una solución de zeaxalenona clarificada. La temperatura del disolvente durante la separación, ha de ser lo suficientemente alta como para mantener la zeaxalenona en solución y lo suficientemente baja como para evitar la disolución del resto de los sólidos. Por lo general, se obtienen buenos resultados con temperaturas ambiente o inferiores, y hasta temperaturas por debajo del punto de ebullición del disolvente orgánico acuomiscible, por ejemplo, entre 10° y 60° C, de preferencia entre 20° y 40° C. Los sólidos pueden ser desechados o re-extraídos para obtener los restos de zeaxalenona.

La zeaxalenona de la solución clarificada se precipita, preferiblemente en cantidad cuantitativa, incrementando la proporción entre el agua y el disolvente orgánico acuomiscible. Este incremento se puede conseguir, eliminando todo el disolvente de la solución de zeaxalenona clarificada por un método apropiado, como pueda ser evaporación bajo corriente de aire, o destilación a presión atmosférica o baja presión. La destilación a baja presión, preferiblemente a 200 mm Hg o inferior, es el método más conveniente de extracción del disolvente orgánico acuomiscible. Cuando se emplea este método de extracción del disolvente, la ausencia de éste puede determinarse controlando la temperatura en la parte superior de la columna de destilación. Una elevación de la temperatura hasta aproximadamente el punto de ebullición del agua a la presión empleada, indica que substancialmente todo el disolvente ha sido extraído.

Otro sistema de incrementar la proporción entre el agua y el disolvente orgánico acuomiscible en la solución de zeax-

ralenona clarificada, es la adición de agua. Se añade agua hasta que la zearalenona cesa de precipitar a la adición de más agua. Un método simple para determinar cuando se ha añadido suficiente cantidad de agua, es el siguiente:

5 Se filtra en un tubo de ensayo una pequeña cantidad de la mezcla. Si la zearalenona no precipita cuando se añade agua al tubo de ensayo, se habrá obtenido esencialmente una precipitación cuantitativa.

Tras la precipitación, la zearalenona se separa de sus aguas
10 madres por cualquier método apropiado, por ejemplo filtración o centrifugación. Durante la separación, la temperatura de la mezcla se mantiene a un nivel tal, que la zearalenona sea substancialmente insoluble en sus aguas madres. Generalmente, resulta satisfactoria una gama de temperaturas
15 de entre 0° y 40° C; de preferencia, entre 15° y 25° C. Los cristales de zearalenona resultantes pueden lavarse con agua y desecarse.

El método de recuperación de ésta invención da rendimientos de aproximadamente el 80 % y purezas del producto de entre
20 el 85 y el 95 %. Otra ventaja más del método, es que la filtración de las mezclas de suspensión que contienen la zearalenona, como es el caso de los licores de fermentación, se ve muy facilitada por la adición de un disolvente orgánico acuomiscible. Apenas se requieren adyuvantes a la fil-
25 tración, con lo que se simplifica la recuperación y se consiguen mejores rendimientos. La aplicación de éste invento proporciona un eficaz método de recuperación, en el que son necesarias cantidades mínimas de disolvente orgánico, se trabaja convenientemente con equipos de manipulación de lí-
30 quidos y se obtienen condiciones de mayor seguridad en comparación con el uso de disolventes orgánicos puros.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar el método de

la presente invención, pero de ningún modo limitan ésta.

EJEMPLO I

Se preparó un licor de fermentación conteniendo zeaxalenona, de la siguiente manera.

5 Una fase A de fermentación se inició, con 100 ml de caldo nutritivo de Bennett introducidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, junto con 5 ml de una suspensión micelial de una cepa de Gibberella Zeae sumergible productora de zeaxalenona. El caldo Bennett tenía la siguiente composición:

10	Glucosa	10 g/l
	NZ Amina Tipo A	2 g/l
	Extracto de levaduras	1 g/l
	Extracto de carne	1 g/l
	Cloruro sódico	2.5 g/l
15	H ₂ O hasta volumen	

NZ Amina Tipo A es un hidrolizado pancreático de caseína que contiene, en forma de aminoácidos y péptidos, todos los aminoácidos originalmente presentes en la caseína. Se puede adquirir en la Sheffield Chemical División Of National Dairy Products, Norwich, New York.

20 El matraz se incubó a 30° C durante 20 - 24 h en un agitador rotatorio.

En una fase B, se llenaron 6 matraces, con 5 ml de la mezcla de la Fase A y 100 ml de caldo de Bennett. Se utilizaron las mismas condiciones de fermentación que en la Fase A.

25 En una Fase C se rellenaron 6 matraces Erlenmeyer de 6 litros de capacidad equipados con asa lateral y tubo flexible de transferencia de inócula y que contenían 2 litros de caldo Bennett, cada uno con la totalidad del contenido de cada uno de los matraces de la fase B. La mezcla se incubó durante 24 h a 30° C en un agitador alternativo.

50 galones de caldo Bennett se prepararon en cada uno de los dos fermentadores de semillas de 100 galones de capacidad, para la fase de inoculación final. Estos recipientes de fermentación fueron inoculados cada uno, con 3 matraces de la Fase C. Las mezclas se incubaron durante 24 h. a 28° 30° C. La agitación y aireación de cada mezcla se consiguió manteniendo un flujo de aire a través de un tubo rociador circular, de 5 a 7 piés cúbicos por minuto.

El contenido de ambos fermentadores de semillas se utilizó para inocular 1350 galones de medio de producción (volumen total 1450 galones). El medio de producción tenía la siguiente composición:

Glucosa	330 g/l
Aceite de grasa de cerdo	600 ml
Cloruro potásico	0'25 g/l
Sulfato magnesico.7H ₂ O	0'25 g/l
Fosfato potásico dibásico anhidro	0'50 g/l
Urea	4'10 g/l
NZ Amida Tipo A (Sheffield)	3'00 g/l
Sulfato zinc.7H ₂ O	1'0 ppm
Agua destilada hasta volumen	

El medio se sometió a autoclave, a 121° C durante 14 m, y se bombeó rápidamente hacia una trampa de refrigeración pre-enfriada. La mezcla se inoculó entonces con el contenido de los fermentadores de semillas y se incubó a 21° - 22° C durante 21 días. El medio de aireo por medio de un flujo de aire a través de un rociador circular, a razón de 180 piés cúbicos por minuto. La agitación se realizó por medio de un rotor de triple turbina a un ritmo de 105 revoluciones por minuto.

A cada una de 8 porciones de 500 ml de licor de fermenta-

TABLA I

Serie	Licor fermentac.		Torta filtración		Filtrado		Pptd Zearalenona		
	Anal. zearaleno.	g/l	Peso Analisis z.	peso %	Volumen ml	Anal. z.	Peso pureza Recuper.	g	%(peso) %(peso)
1	8'1	43'5	0'35	-	510	Nada	4'25	94'9	99'5
2	8'1	44'1	0'06	-	514	Nada	4'50	90'6	Cuant.
3	14'5	46'8	0'00	-	513	Nada	8'23	97'7(2)	Cuant.
4	14'5	46'7	0'21	-	509	Nada	7'60	94'5	98'0
5	11'6	-	-	-	-	-	6'10	90'3	95'0
6	11'6	-	-	-	-	-	6'25	91'0	98'0
7	17'0	-	-	-	-	-	9'45	92'4	Cuant.
8	17'0	-	-	-	-	-	9'30	92'2	Cuant.

(1) Peso de micelio aproximadamente 10 - 15 g

(2) El análisis de pureza puede ser más alto.

EJEMPLO II

En cada una de 6 series de producción, a 1500 ml de licor de fermentación preparados por el método descrito en el Ejemplo I, se les añadieron 1500 ml de acetona. Luego se
 5 adicionó carbon a la mezcla, como queda indicado en la Ta-
 bla II. Esta se agitó durante media hora, se filtro y la
 torta de filtración se enjuagó con 300 ml de acetona a-
 cuosa al 50 %. Las soluciones de filtrado y de lavado se
 combinaron, extrayéndose la acetona de la siguiente mane-
 10 ra:

Se utilizó un extractor de acetona compuesto por un reci-
 piente de resina equipado con agitador, embudo de separa-
 ción, termómetro, condensador y controles de vacío. El re-
 cipiente de resina se cargó con 200 ml de agua, se calentó
 15 hasta aproximadamente 60° C y luego se adicionó lentamente
 el filtrado de acetona, durante un periodo de tiempo de un
 cuarto de hora. El proceso se dió por terminado cuando la
 temperatura del recipiente alcanzó los 70° C a 200 mm Hg.
 La mezcla resultante agua-zearalenona se refrigeró a 20° C
 20 y se filtró a través de un embudo ancho de cristal sinte-
 rizado. Los cristales de zearalenona se lavaron con agua
 y se desecaron.

Los niveles de zearalenona se determinaron analíticamente
 en el licor de fermentación, la torta de filtración, el
 25 filtrado y la zearalenona recuperada. Los resultados que-
 dan reflejados en la Tabla II:

TABLE II

Serie	<u>Licor fermentación</u>	<u>Carbón</u>	<u>Zearalenona precipitada</u>	
	Analisis zearalenona g/l	g	Peso g	Pureza % (peso) Recuperac. % (peso)
1	17'0	Ninguno	27'30	91'0 97'4
2	17'0	20'0	26'80	91'4 96'1
3	13'3	15'0	20'80	94'6 98'4
4	13'3	15'0	20'35	94'7 96'5
5	13'6	15'0	21'00	92'2 94'4
6	13'6	15'0	20'70	94'0 95'3

EJEMPLO III

Se repite el experimento del Ejemplo II en todos sus detalles esenciales, excepto en que se utilizan 4500 ml de metanol en lugar de 1500 ml de acetona. Se obtienen rendimientos satisfactorios de zearalenona.

EJEMPLO IV

Se repite el experimento del Ejemplo II en todos sus detalles esenciales, excepto en que se utilizan 4500 ml de etanol en lugar de 1500 ml de acetona. Se obtienen rendimientos satisfactorios de zearalenona.

EJEMPLO V

Se filtró un licor de fermentación conteniendo zearalenona (1500 ml), preparado según se ha descrito en el Ejemplo I. La torta de filtración fue puesta en suspensión a temperatura ambiente, en 3000 ml de acetona al 50 % en volumen, en agua, durante un periodo de tiempo de 1 hora. La mezcla de suspensión fue luego filtrada y los sólidos resultantes lavados con 300 ml de acetona en agua al 50 % en volumen. El filtrado fue transferido a un aparato de destilación de vacío y destilado lentamente a presión de 200 mm Hg, hasta que la temperatura en la parte superior de la columna de destilación alcanzó 67° C. El filtrado se refrigeró luego a unos 20° C y la zearalenona precipitada se extrajo por filtración. Los cristales de zearalenona se lavaron con agua y se desecaron. El proceso dió rendimientos de recuperación de un 87.5 % en peso (basado en el 100 % del producto) de una substancia que contenía alrededor del 94 % en peso, de zearalenona.

EJEMPLO VI

Se filtró un licor de fermentación conteniendo zearalenona (1500 ml), preparado según se ha descrito en el Ejemplo I. La torta de filtración se suspendió a temperatura ambiente

en 1500 ml de metanol, durante un periodo de tiempo de 1 hora. La mezcla de suspensión fue luego filtrada y los sólidos resultantes lavados con 300 ml de metanol. El filtrado fue transferido a un aparato de destilación de vacío y diluido con unos 600 ml de agua. La mezcla se destiló a presión de unos 200 mm Hg, hasta que la temperatura en la parte superior de la columna de destilación alcanzó unos 60^o C. El filtrado se refrigeró luego a unos 20^o C y los cristales de zearalenona se lavaron con agua y se desecaron. El proceso dió rendimientos de recuperación de un 98 % en peso (basado en el 100 % del producto), de una substancia que contenía alrededor de un 94 % en peso, de zearalenona.

EJEMPLO VII

Se añadieron unas 13 libras de tierra de diatomeas, como adyuvante de filtración, a 156 galones de licor de fermentación conteniendo zearalenona, que se preparó como se ha descrito en el Ejemplo I, siendo después filtrada la mezcla. La torta de filtración resultante fue suspendida en 146 galones de una mezcla de acetona en agua al 72 % en volumen, durante 1 hora aproximadamente. La mezcla de suspensión se filtró y el filtrado transferido a un evaporador. La solución se destiló a presión de unos 100 mm Hg, hasta que la temperatura alcanzó los 53^o C. Luego se refrigeró a 30 - 35^o C y se filtró. El filtrado se devolvió al evaporador y se destiló de nuevo a una temperatura de 55^o C y luego se volvió a filtrar. Los cristales de zearalenona recuperados se juntaron y se desecaron. El proceso dió rendimientos de recuperación de un 84 % en peso (basado en el 100 % del producto), de una substancia que contenía alrededor de un 85 % en peso de zearalenona.

EJEMPLO VIII

Se repitió el experimento del Ejemplo VI en todos sus deta-

lles esenciales, excepto en que se empleó etanol en lugar de metanol. La zearalenona se recuperó con rendimientos y pureza de producto aceptables.

EJEMPLO IX

- 5 Se repitió el experimento del Ejemplo VI en todos sus detalles esenciales, excepto en que se empleó 2-propanol en lugar de metanol. La zearalenona se recuperó con rendimientos y pureza de producto aceptables.

EJEMPLO X

- 10 Se repitió el experimento del Ejemplo V en todos sus detalles esenciales, excepto en que se empleó una mezcla metanol en agua, al 70 % en volumen, en lugar de la mezcla de acetona en agua, al 50 % en volumen. La zearalenona se recuperó con rendimientos y pureza de producto aceptables.

15 EJEMPLO XI

- Se preparó un sustrato sólido de fermentación, tal como se describe en el Ejemplo II de la Patente U.S. 3.196.019, con cedida a Andrews. 100 g del sustrato fermentado se ponen en suspensión en 200 ml de una solución de acetona en agua, al 60 % en volumen. La mezcla de suspensión se filtra a temperatura ambiente y la torta de filtración se lava con otros 50 ml de acetona en agua, al 50 % en volumen. El filtrado y las aguas de lavado se combinan y se transfieren a un aparato de destilación. Esta solución se destila a 200 mm Hg de presión, hasta que la temperatura en la parte superior de la columna de destilación alcance 67° C. La solución destilada se refrigera a unos 20° C y la zearalenona precipitada se recupera con rendimientos y pureza satisfactorios.
- 20
- 25

REIVINDICACIONES:

- 1.- Un método de recuperación de zearalenona a partir de una mezcla acuosa formada por una fase acuosa y una fase sólida, conteniendo, en la fase sólida, zearalenona y otros sólidos no disueltos, que abarca:
- 5 a) Puesta en contacto de la zearalenona con una mezcla zearalenona-selectiva, formada esencialmente por agua y un disolvente orgánico acuomiscible en cantidades suficientes para disolver y transferir selectivamente la zearalenona desde la fase sólida a la fase acuosa y, proporcionar una solución de zearalenona bombeable.
- 10 b) Extracción de los sólidos no disueltos a partir de la solución de zearalenona, a una temperatura lo suficientemente alta como para mantener la zearalenona en solución y lo suficientemente baja como para impedir la disolución de los
- 15 sólidos, dando lugar así, a una solución de zearalenona clarificada.
- c) Incrementar la proporción entre el agua y el disolvente orgánico acuomiscible, en la solución de zearalenona clarificada, para precipitar aquella.
- 20 d) Separación de la zearalenona precipitada de sus aguas madres, a una temperatura a la que la zearalenona sea substancialmente insoluble en dichas aguas.
- 2.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico acuomiscible se seleccione de un grupo formado por acetona, metanol, etanol, propanol y butanol.
- 25 3.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico acuomiscible, es acetona.
- 30 4.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que el disolvente acuomiscible es metanol.

- 5.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 3, en el que la mezcla de agua y acetona contiene acetona a una concentración de entre un 25 % y un 100 % en volumen.
- 5 6.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 3, en el que la mezcla de agua y acetona contiene acetona a una concentración de entre el 40 % y el 60 % en volumen.
- 7.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 4, en el que la mezcla de agua y metanol, contiene metanol a una concentración de entre el 40 % y el 75 % en volumen.
- 10 8.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 4, en el que la mezcla de agua y metanol, contiene metanol a una concentración de entre el 50 % y el 75 % en volumen.
- 9.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que la temperatura a la que los sólidos no disueltos son extraídos de la solución de zearalenona, se sitúa
15 entre 10° y 60° C, y la temperatura a la que la zearalenona precipitada es separada de sus aguas madres se sitúa entre 0° y 40° C.
- 10.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que la temperatura a la que los sólidos no disueltos son extraídos de la solución de zearalenona, se sitúa
20 entre 20° y 40° C, y la temperatura a la que la zearalenona precipitada es separada de sus aguas madres, se sitúa entre 15° y 25° C.
- 25 11.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que la proporción entre agua y disolvente orgánico acuomiscible, en la solución de zearalenona clarificada, se incrementa destilando para eliminar el disolvente, hasta que la zearalenona haya sido cuantitativamente precipitada de una manera substancial.
- 30 12.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que la proporción entre agua y disolvente or-

gánico acuomiscible, en la solución de zearalenona clarificada, se incrementa añadiendo agua, hasta que la zearalenona haya sido cuantitativamente precipitada de forma substancial.

5 13.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 1, en el que la mezcla acuosa formada por una fase acuosa y una fase sólida, es un licor de fermentación, acuoso, líquido y conteniendo zearalenona, resultante del cultivo en inmersión de una estirpe productora de zearalenona del
10 microorganismo denominado Gibberella zeae, en un medio nutritivo; y la zearalenona en dicho licor de fermentación se disuelve, adicionando un disolvente orgánico acuomiscible, a dicho licor, para formar una mezcla disolvente de zearalenona compuesta por agua y disolvente orgánico acuomiscible.
15 ble.

14.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que el disolvente orgánico acuomiscible es seleccionado de entre un grupo formado por acetona, metanol, etanol, propanol y butanol.

20 15.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que el disolvente orgánico acuomiscible es acetona.

16.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que el disolvente orgánico acuomiscible es
25 metanol.

17.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 15, en el que la mezcla de agua y acetona, contiene acetona a una concentración de entre el 25 % y el 100 % en volumen.

30 18.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 15, en el que la mezcla de agua y acetona, contiene acetona a una concentración de entre el 40 % y el 60 % en vo

lumen.

- 19.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 16, en el que la mezcla de agua y metanol, contiene metanol a una concentración de entre el 40 % y el 75 % en volumen.
- 20.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 16, en el que la mezcla de agua y metanol, contiene metanol a una concentración de entre el 50 % y el 75 % en volumen.
- 21.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que la temperatura a la que los sólidos no disueltos son extraídos de la solución de zearalenona, se situa entre 10° y 60° C, y la temperatura a la que la zearalenona precipitada es separada de sus aguas madres, se situa entre 0° y 40° C.
- 22.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que la temperatura a la que los sólidos no disueltos son extraídos de la solución de zearalenona, se situa entre 20° y 40° C, y la temperatura a la que la zearalenona precipitada es separada de sus aguas madres, se situa entre 15° y 25° C.
- 23.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que la proporción entre agua y disolvente orgánico acuomiscible en la solución de zearalenona clarificada, se incrementa destilando para expulsar el disolvente, hasta que la zearalenona haya sido cuantitativamente precipitada de una forma substancial.
- 24.- Un método tal como el especificado en la reivindicación 13, en el que la proporción entre agua y disolvente orgánico acuomiscible en la solución de zearalenona clarificada, se incrementa añadiendo agua hasta que la zearalenona haya sido cuantitativamente precipitada de una forma

substancial.

25.- Un método para recuperación de zearalenona.

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

Barcelona, 16 de Agosto de 1976.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, fluid strokes that form a cursive name, positioned below the typed text.