



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A1
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	461.344	
	4-8-1977	

6 NOV. 1978

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

③① PRIORIDADES:	③② FECHA	③③ PAIS
③① NUMERO		
711.843	5-8-76	EE.UU.
793.274	3-5-77	"

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤① CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑥② PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D // E21B	

⑤④ TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN CALDO DE FERMENTACION QUE CONTIENE EL COICIDE XANTHOMONAS"

⑦① SOLICITANTE (S)

PFIZER INC. (CASE 5758 A)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

235 East 42nd Street, Nueva York, Nueva York, Estados Unidos de América

⑦② INVENTOR (ES)

William Charles Wernau

⑦③ TITULAR (ES)

⑦④ REPRESENTANTE

DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ (P-66.641)

POOR QUALITY

6664

Hay informes publicados extensos relacionados con la producción de coloides hidrofílicos mediante la propagación aeróbica de bacterias del género Xanthomonas en un medio nutritivo acuoso. El trabajo anterior a este ramo fue llevado a cabo en Northern Regional Research Laboratory del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Peoria, Illinois; se describe en la Patente Norteamericana Número 3,000,790. Se describen procedimientos de fermentación modificados en las Patentes Norteamericanas Números 3,020,206; 3,391,060; 3,427,226; 3,433,708; 3,271,267; 3,251,749, 3,281,329; 3,455,766; 3,565,763; 3,594,280; y 3,391,061.

El coloide hidrofílico (goma de xantano) producido mediante Xanthomonas campestris es un polisacárido que contiene manosa, glucosa, ácido glucurónico, radicales de O-acetil, y ácido pirúvico enlazado con acetal en una relación molar de 2:2:1:1:0.5. Esta goma y sus derivados han encontrado aplicaciones extensas alimenticias e industriales. Es de especial interés el enfoque aumentado en el uso de la goma de xantano en el desplazamiento de petróleo de depósitos parcialmente agotados.

Típicamente, el petróleo se recupera de depósitos subterráneos a través de una serie de operaciones en secuencia.

Un nuevo pozo por lo general producirá una cantidad limitada de petróleo como resultado de la liberación de la presión interna en el pozo. A medida que esta presión se agota, es necesario bombear cantidades adicionales de petróleo por medios mecánicos. Estas medidas recuperan sólo aproximadamente el 25 por ciento del petróleo total almacenado en el depósito. Una gran cantidad del petróleo queda todavía atrapado dentro de los poros de la formación. La mejora adicional de la recuperación luego puede efectuarse mediante una recuperación secundaria. En un método de recuperación, se lleva a cabo una inundación con agua bombeando agua hacia el pozo o una serie de pozos, desplazando parte del petróleo atrapado de la roca porosa y recogiendo el petróleo desplazado de los pozos circundantes. Sin embargo, la inundación de agua todavía deja de aproximadamente 55 a 60 por ciento del petróleo disponible atrapado en la formación. La explicación de este fenómeno es que el agua tiene una viscosidad muy baja en comparación con el petróleo crudo y tiende a seguir la trayectoria de menor resistencia, penetrando a través del petróleo y dejando grandes cavidades sin tocar. Además, las fuerzas de la superficie en la formación tienden a retener el petróleo e impedir su desplazamiento.

Se han desarrollado números de procedimientos en los años recientes para recuperar cantidades adicionales del petróleo en estos depósitos mediante el uso de soluciones de control de movilidad que mejoran el desplazamiento del petróleo aumentando la viscosidad o la permeabilidad del fluido de desplazamiento. Son de interés aquellos procedimientos de recupe-

ración mejorados que emplean inundación de polímero con un polisacárido o una poliacrilamida para aumentar la viscosidad del fluido de desplazamiento. Las variaciones de este procedimiento incluyen el uso de surfactantes y co-surfactantes para liberar el petróleo de la formación de la roca. Las poliacrilamidas se ha encontrado que adolecen de deficiencias tales como pérdida de viscosidad en salmueras y seria sensibilidad al esfuerzo cortante. Puesto, que tal y como se ha dado a conocer en el ramo anterior, la goma de xantano es insensible a las sales (no se precipitan ni pierde viscosidad bajo condiciones normales), es estable al esfuerzo cortante, es termoestable y es estable en viscosidad a través de una amplia escala de valores de pH, la goma de xantano es un buen agente de desplazamiento. Además, la goma es difícilmente absorbida en los elementos de las formaciones de roca porosas y proporciona viscosidades útiles para la recuperación mejorada del petróleo (de 5 a 90 unidades de Centipoises a $1.32 \text{ segundos}^{-1}$ de régimen de esfuerzo cortante) a bajas concentraciones (de 100 a 3000 partes por millón).

El uso de las soluciones de goma de xantano o los derivados de la goma de xantano para la recuperación del petróleo se ha descrito en las Patentes Norteamericanas Números 3,243,000; 3,198,268; 3,532,166; 3,305,016; 3,251,417; 3,319,606; 3,319,715; 3,373,810, 3,434,542 y 3,729,460. Se sugiere en la Patente Norteamericana Número 3,305,016 que las soluciones

acuosas que contienen el heteropolisacárido en cantidad suficiente para aumentar la viscosidad, se emplean como el agente espesador para preparar soluciones viscosas de inundación de agua. El polisacárido puede prepararse, separarse, purificarse y añadirse luego. Alternativamente, de conformidad con esta referencia, todo el cultivo después de añadir un bactericida (v. gr. formaldehído) para matar y exterminar las bacterias, se puede añadir al agua de inundación.

La Patente Norteamericana Número 3,000,790 describe el cultivo de una bacteria de Xanthomonas en un medio aerado del pozo que contiene glucosa comercial, una fuente orgánica de nitrógeno, fosfato de dipotasio y elementos de traza apropiados. La fuente de nitrógeno orgánico usualmente empleada es la de materiales solubles de los destiladores. El uso de esta fuente de nitrógeno orgánico aporta una cantidad considerable de materiales insolubles al caldo de fermentación.

Los procedimientos descritos en las Patentes Norteamericanas Números 3,000,790 y 3,391,060 y otros procedimientos de fermentación enumerados anteriormente, rinden cambios de fermentación finales que contienen cantidades considerables de materia insoluble aún cuando se diluyen con agua, para inyectarse en las formaciones subterráneas petrolíferas para impartir el control de movilidad necesaria y deseado para el desplazamiento del petróleo. La materia en partículas y en ciertos casos, las células de Xanthomonas en este caldo entero pronto obturarían

la formación petrolífera en el sitio de la inyección y por lo tanto ensuciarían el pozo e impedirían cualquier recuperación de petróleo adicional. Además, se encontraría el mismo problema con la goma de xantano reconstituida precipitada y separada de estos caldos de fermentación. Las tendencias de obturación de estos caldos de fermentación pueden evitarse mediante filtración a través de filtros de hoja de tierra de diatoméas a fin de remover las células de Xanthomonas y la materia en partículas y la materia coloidal. Sin embargo, estos pasos de filtración adicionales son costosos y se suman significativamente a los factores de costo totales para la recuperación de petróleo mejorada.

La Patente Norteamericana Número 3,853,771 resuelve el problema de la obturación de los caldos de fermentación enteros reclamando un procedimiento para disolver o dispersar los microorganismos celulares que consiste de poner en contacto estos materiales con una solución acuosa que contiene por lo menos un surfactante efectivo para dispersar las capas de la pared externa de las células de microorganismos, por lo menos un agente de quelación para dispersar las capas de la pared interna de las células del microorganismo y por lo menos un hidróxido de metal alcalino efectivo para mejorar las acciones de dispersión.

La Patente Norteamericana Número 4,010,071 describe un procedimiento para clarificar los caldos de fermentación.

ción y otras suspensiones acuosas que contienen una goma de xantano disuelta y sólidos suspendidos que resultan de la fermentación mediante tratamientos con una cantidad pequeña de una enzima de proteasa. La capacidad de la inyección de las soluciones acuosas que contienen goma de xantano clarificadas de esta manera, se mejora en las operaciones de inundación del pozo de petróleo con respecto a las soluciones que no se han tratado de esta manera. Sin embargo, este tratamiento, no vence los problemas de obturación debido a la presencia de los materiales orgánicos no proteicos o los materiales inorgánicos insolubles presentes en el medio de fermentación o que se producen durante el curso de la fermentación.

El objeto del procedimiento de la Patente Norteamericana Número 3,391,060, es recuperar un producto de polisacárido de pureza considerable sin el uso de procedimientos de separación extensos. Se recupera una goma de xantano de calidad superior, de gran viscosidad, de color claro y de alta pureza del caldo de fermentación de Xanthomonas. De conformidad con esta patente, la recuperación se simplifica y se evitan los procedimientos de purificación complicados mediante la reposición de una fuente orgánica de nitrógeno en el caldo con una fuente inorgánica de nitrógeno (es decir, nitrato de amonio). Sin embargo, el procedimiento de fermentación descrita en la presente no es económico debido a que se requieren períodos de tiempo de reacción prolongados, y se obtienen bajos

rendimientos del biopolímero.

El método para mejorar la permeabilidad de las soluciones de control de movilidad mediante la adición de ciertos ácidos carboxílicos substituidos por hidróxi, tales como ácidos málico, tartárico, cítrico, glucónico, láctico y salicílico, se ha descrito en la Patente Norteamericana Número 2,867,279.

Esta invención está relacionada con un procedimiento económico para preparar caldo de fermentación que contiene el coloide Xanthomonas apropiado para la preparación de soluciones de control de movilidad que se usan en la recuperación de petróleo que consiste de fermentar aeróbicamente un organismo de Xanthomonas en un medio nutritivo acuoso cuyos ingredientes están constituidos de un carbohidrato, una fuente de nitrógeno, un ácido de ciclo Krebs, calcio quelado y iones de manganeso y iones de hierro. El caldo entero producido produce soluciones de control de movilidad de aproximadamente 100 a 3000 partes por millón del coloide Xanthomonas que están esencialmente exentos de materia insoluble y que tiene un tamaño de partícula mayor de aproximadamente 3 micrones.

La presente invención proporciona ahora por primera vez un procedimiento práctico para preparar un caldo de fermentación de Xanthomonas que sin tratamiento o clarificación proporciona soluciones de control de movilidad para usarse en la recuperación del petróleo, que tiene una concentración de uso de aproximadamente 100 a 3000 partes por millón del coloide

de Xanthomonas que está esencialmente exentos de materia insoluble que tienen un tamaño de partículas mayor de aproximadamente 3 micrones. De conformidad con esta invención, el caldo de fermentación entero puede usarse directamente como una solución de control de movilidad tal como cuando la cantidad del coloide producida durante la fermentación queda dentro de la escala deseada de concentración de uso. Alternativamente, el caldo puede diluirse con agua o con una solución de agua, tal como una salmuera para reducir el nivel del coloide a la escala deseada. Los aditivos para modificar las propiedades de las soluciones de control de movilidad pueden emplearse además de los caldos enteros o no clarificados de la presente invención.

Se ha encontrado que el petróleo en núcleos de los campos de petróleo por lo general se recuperará de manera efectiva mediante la goma de xantano si la solución de polisacárido a la concentración de uso puede hacerse una prueba de Filtrabilidad Millipore, tal y como se describirá a continuación. Los tamaños de poro típicos de los filtros de Millipore que se usan para esta prueba son de 0.45 a 3.0 micrones.

Además de la filtrabilidad de Millipore, las pruebas de núcleo se llevan a cabo tal y como se describe por W.B. Gogarty en Control de Movilidad con Soluciones Poliméricas, Documento (SPE 1566B) presentado en la Society of Engineers 41st Annual Fall Meeting celebrado en Dallas, Texas, del 2 al 5 de octubre de 1966.

Una particularidad novedosa de los caldos de fer-

mentación de la presente invención, que se distingue de manera importante, de los caldos y preparaciones de fermentación de Xanthomonas dados a conocer anteriormente, es la necesidad evidente de filtración o clarificación costosa y retardada. Los factores importante que ayudan a ser esto posible son los siguientes:

1. Todos los ingredientes nutritivos son esencialmente solubles en agua o se convierten en esencialmente solubles en agua durante la fermentación o antes de la inyección.
2. Se mantiene asepsia absoluta durante la fermentación y se añade de preferencia un bactericida al final de la fermentación.
3. De preferencia no se usa agua dura con altas concentraciones de iones de calcio como la reposición para el medio de fermentación. Los niveles bajos de iones de calcio (de menos de aproximadamente 100 miligramos por litro, de preferencia menos de aproximadamente 60 miligramos por litro) pueden secuestrarse mediante la adición de un agente de quelación tal como ácido etilendiamintetraacético o de preferencia ácido cítrico.
4. Las cantidades de iones de manganeso pueden limitarse para evitar la formación de cristal contaminante y la precipitación de las sales de calcio y fosfato insolubles (típicamente de aproximadamente 0.75 a 60 partes por millón, de preferencia de 1.5 a 2.4 partes por millón).

5. Se controlan las cantidades de hierro vestigial para evitar la formación de cristales contaminantes y la precipitación de las sales de fosfato y calcio insolubles.

Es importante para el procedimiento de la presente invención la incorporación de los siguientes ingredientes para activar el crecimiento rápido de las células y para aumentar el rendimiento de xantano mientras que se logran las soluciones de control de movilidad deseadas que esencialmente no tienen materia insoluble con un tamaño de partículas mayor de aproximadamente 3.0 micrones.

1. Calcio quelatado - de aproximadamente 1 a 200 partes por millón, de preferencia de aproximadamente 40 a 60 partes por millón.

2. Hierro vestigial - típicamente de aproximadamente 0.25 a 20 partes por millón de preferencia de 0.5 a 8 partes por millón.

3. Acido de ciclo Krebs - de aproximadamente 0.1 a 10 gramos por litro de preferencia de aproximadamente 1 gramo por litro.

Se añaden cantidades vestigiales de iones de manganeso y ferroso en forma de sales tales como $MnSO_4 \cdot H_2O$, $MnCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y $FeCl_2$.

Mediante ácido de ciclo Krebs se quiere dar a entender un ácido asimilable que se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido oxaloacético, ácido l-málico,

ácido fumárico, ácido succínico y ácido oxalosuccínico. El ácido cis-aconítico es un ácido de ciclo Krebs que no es útil para el procedimiento de esta invención. El ácido preferido es el ácido cítrico debido a su eficiencia adicional como un agente secuestrante para los iones de calcio. El ácido nítrico puede incorporarse en el medio de fermentación a una concentración de, aproximadamente 0.5 a 2 gramos por litro, de preferencia a aproximadamente 1 gramo por litro.

En la práctica de esta invención, un medio de fermentación apropiado se inocula con un organismo del género Xanthomonas. El medio de inóculo puede ser el caldo YM (Difco) o un medio que contiene glucosa cruda (cereales), fosfato de sodio y de potasio, sulfato de magnesio y cualesquiera de una variedad de fuentes orgánicas de nitrógeno, tales como el producto de digestión enzimático de frijol de soya (Peptona de Soya Tipo T, Humko-Sheffield Chemical Co.) o un producto de digestión enzimático de caseína (NZ-Amina YT, Humko-Sheffield Chemical Co.). Después de la propagación aeróbica durante aproximadamente 30 horas a temperatura de 28°C., una alícuota se traslada a un fermentador para el inóculo de segunda etapa.

Hay presente un carbohidrato apropiado en el medio nutritivo a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso. Los carbohidratos apropiados incluyen, por ejemplo, glucosa, sucrosa, maltosa, fructosa, lactosa, melaza de remolacha invertida tratada, azúcar invertida,

almidón adelgazado filtrado de calidad superior o mezclas de estos carbohidratos. Los carbohidratos preferidos son glucosa, maltosa, fructosa, hidrolizados de almidón filtrados o mezclas de los mismos.

El nitrógeno inorgánico está presente en el medio nutritivo a concentración de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.35 por ciento en peso, de preferencia de 0.07 a 0.25 por ciento en peso. El nitrato inorgánico es la fuente de nitrógeno preferida; el nitrato de amonio a aproximadamente 1 gramo por litro, nitrato de sodio a aproximadamente 2 gramos por litro o nitrato de potasio a aproximadamente 2.4 gramos por litro, pueden usarse asimismo. La fuente de nitrógeno preferida en esto así como el medio de producción es inorgánica. Sin embargo, las fuentes de nitrógeno orgánicas pueden también utilizarse aún cuando acentúan la formación de una célula grande de Xanthomonas con la condición que se mantenga el requisito total de una exención considerable de materiales insolubles con un tamaño de partícula mayor de aproximadamente 3 micrones.

El magnesio en la forma de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o sales de epsom, de 0.1 a 1.0 gramo por litro, se añade junto con iones de manganeso y hierro vestigiales. Un agente de quelación tal como el ácido etilendiamintetraacético o de preferencia el ácido cítrico que funciona como un ácido de ciclo Krebs de promoción de crecimiento y un agente secuestrante para cualquier calcio presente, puede añadirse asimismo.

Se añaden cantidades suficientes de los fosfatos de mono- y di-potasio para amortiguar el medio a un pH de aproximadamente 5.9 a 8.5, de preferencia de 6.0 a 7.5. Después de la propagación aeróbica durante aproximadamente 20 a 40 horas a temperatura de 24° a 34°C., de preferencia de 28° a 30°C., una alicuota se traslada a un fermentador que contiene el medio de producción.

El medio de producción es semejante en composición a aquel del medio de inóculo de segunda etapa con la excepción de que se usan de preferencia fosfatos de sodio en vez de los fosfatos de potasio debido a sus costos más bajos y se añade una cantidad pequeña de calcio en la forma de una sal por ejemplo cloruro de calcio o nitrato de calcio u óxido tal como cal para aumentar el rendimiento de xantano. La cantidad de calcio que se añade depende de la cantidad de calcio presente en el agua usada para la reposición del medio, la fuente de nitrógeno usada y la especie y cepa del organismo de Xanthomonas empleado. Cuando se usa nitrato de sodio o nitrato de potasio, en vez de nitrato de amonio, se requiere menor cantidad de calcio (aproximadamente 27 partes por millón). Pueden también usarse como el medio de reposición el agua desionizada, agua destilada o agua que contiene menos de aproximadamente 20 partes por millón de calcio y otros cationes de fosfato capaz de precipitarse. Los iones de calcio pueden añadirse a una concentración deseada. El papel de los iones de calcio para acentuar la produc-

ción de xantano es uno importante pero es crítico para el procedimiento de la presente invención que se impide de la precipitación de los cationes de calcio excesivos y los otros cationes tales como las sales de fosfato insolubles. Esto se logra, cuando se desea, mediante la adición de un agente de quelación tal como ácido etilendiamintetraacético o cualquier otro compuesto apropiado conocido por aquellas personas expertas en el ramo, a una concentración milimolar de aproximadamente 1 a 20, de preferencia una concentración milimolar de 2 a 8.

El pH del medio de fermentación es bastante importante para el crecimiento apropiado de las bacterias de Xanthomonas. La escala preferida es de aproximadamente 6.0 a 7.5. El control del pH dentro de esta escala se puede obtener mediante el uso de un compuesto amortiguador tal como el fosfato del ácido de disodio. El ácido etilendiamintetraacético o cualquier otro agente de quelación apropiado se añade también en la solución amortiguadora que se utiliza para el control del calor del pH para impedir la precipitación de los iones de calcio introducidos en el agua usada para la reposición del medio como las sales de calcio insolubles. El pH de preferencia se controla durante el ciclo de fermentación mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio de potasio lo cual tiene ventajas adicionales para disminuir la viscosidad del caldo sin afectar el rendimiento del xantano y la eliminación de la necesidad de la quelación de la solución amortiguadora.

A fin de obtener una fermentación rápida, es esencial que haya una cantidad correcta de oxígeno disponible para el crecimiento del cultivo bacteriano. El medio de fermentación se aerea para proporcionar suficiente oxígeno para producir un valor de oxidación de sulfito dentro de la escala de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3.5 milimoles de oxígeno por litro por minuto. Una descripción del valor de oxidación de sulfito se da a conocer en *Industrial Engineering Chemistry* 36, 504 (1936). El valor de oxidación de sulfito es una medida del régimen de absorción de oxígeno en el fermentador bajo las condiciones de agitación y aereación empleadas.

La fermentación se deja continuar a temperatura de aproximadamente 30°C. hasta que el caldo tiene una concentración de xantano de por lo menos aproximadamente 100 partes por millón, de preferencia por lo menos aproximadamente 1.0 por ciento y más, de preferencia por lo menos aproximadamente 1.4 por ciento (de 30 a 96 horas). Las viscosidades del caldo típicamente son por lo menos de aproximadamente 4,000 unidades Centipoise y de preferencia de aproximadamente 7,000 unidades Centipoise.

Es deseable matar todas las células microbianas mediante la adición de un bactericida tal como formaldehído, glutaraldehído, fenol o fenol substituido tal como cresol o hidroxibenceno o un fenol polihalogenado tal como Corexit (Exxon Corporation), o cualquier otro agente de conservación

bien conocido en el ramo. El agente de conservación preferido es el formaldehído a una concentración de aproximadamente 200 a 10,000 partes por millón, de preferencia de aproximadamente 1000 a 3000 partes por millón, que puede añadirse al caldo de fermentación final antes o durante el almacenamiento.

El procedimiento de esta invención trabaja bien para muchas especies de bacterias de Xanthomonas. Las especies ilustrativas incluyen Xanthomonas phaseoli, Xanthomonas malvacearum, Xanthomonas carotae, Xanthomonas begoniae, Xanthomonas incanae y Xanthomonas vesicatoria. La especie preferida es Xanthomonas campestris.

La prueba de filtrabilidad Millipore es un procedimiento experimental que mide el régimen de flujo a través de un filtro Millipore (tamaño de poro de 0.45 a 3.0 micrones) como una función del volumen bajo una presión constante de 2.812 kilogramos porcentímetro cuadrado manométrica. La relación de filtro es la relación del tiempo para recoger la cuarta parte de los 250 mililitros de la solución de control de movilidad hasta el momento de recoger los primeros 250 mililitros de la solución de control de movilidad. Una relación de filtro de 1.0 indica que la solución no tiene tendencia a obturación. Una solución de control de movilidad aceptable tiene una relación de filtro de 1 a 3 (filtro Millipore de 0.45 a 3 micrones), de preferencia de 1.7.

La relación de filtro y el tamaño de filtro

Millipore deseados para probar una solución de control de movilidad específica dependen de la permeabilidad del estrato subterráneo del campo de petróleo para el cual se planea el desplazamiento del petróleo.

Las soluciones de control de movilidad preparadas de caldos de fermentación enteros de la presente invención, tiene relaciones de filtro apropiadas para usarse en la mayoría de los campos de petróleo. Cuando los estratos subterráneos son altamente impermeables, deben emplearse soluciones de control de movilidad con bajas relaciones de filtro. Bajo estas circunstancias, los caldos enteros o no clarificados de conformidad con la presente invención, de preferencia no tienen esencialmente materia insoluble con un tamaño de partícula en exceso de aproximadamente 0.65 micrones. Esto puede lograrse simplemente almacenando el caldo de fermentación final en presencia de aproximadamente 200 a 10,000 partes por millón de formaldehído durante un período de aproximadamente 3 a 4 días. Este procedimiento de añejamiento, contra las células de Xanthomonas de manera que su dimensión pequeña no excede de un tamaño de 0.65 micrones. Las células de Xanthomonas son en forma de bastón y normalmente la dimensión más larga de las células es mayor de 0.65 micrones mientras que la dimensión más corta de las células es de aproximadamente 0.4 a 1.0 micrones. La temperatura de almacenamiento no es crítica y puede variar desde 0° a 135°C., de preferencia de 20° a 45°C. Un recur-

so práctico es el almacenamiento a temperatura ambiente durante un período de tiempo suficiente a fin de que el examen microscópico revele que las dimensiones pequeñas de las células de Xanthomonas no son mayores de 0.65 micrones en tamaño (de 3 a 4 días).

Los siguientes datos muestran la influencia de los ingredientes del medio en las relaciones del filtro de las soluciones de control de movilidad que se preparan de caldo de fermentación añejados:

CUADRO I

Nivel de Ingredientes*

Fuente de nitrógeno	MnSO ₄ ·7H ₂ O (miligramos/ litro)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (miligramos/ litro)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (gramos/litro)	Acido Cítrico (gramos/litro)	% de Xantano	Relación de Filtro** (Tamaño de poro de 0.8 micrones)
NaNO ₃ (2 gramos por litro)	31	10	0.1	1.0	1.76	1.29
	15	10	0.1	1.0	1.90	1.53
	31	5	0.1	1.0	1.86	1.54
	31	10	0.1	0.0	1.79	> 3
	31	10	0.2	1.0	1.79	> 3
	31	10	0.0	1.0	0.90	2.22
NH ₄ NO ₃ (1 gramo por litro)	31	10	0.2	1.0	1.94	1.47
	15	10	0.2	1.0	1.96	1.93
	31	5	0.2	1.0	1.90	1.84
	31	10	0.2	0.0	1.57	> 3
	31	10	0.3	1.0	2.08	> 3
	31	10	0.0	1.0	1.17	2.09

CUADRO I (continuación)

Fuente de nitrógeno	Nivel de Ingredientes*				% de Xantano	Relación de Filtro** (tamaño de poro de 0.8 micrones)
	MnSO ₄ ·7H ₂ O (miligramos/ litro)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (miligramos/ litro)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (gramos/litro)	Acido Cítrico (gramos/litro)		
KNO ₃ (2.4 gramos por litro)	31	10	0.1	1.0	1.72	1.54
	15	10	0.1	1.0	1.77	1.72
	31	5	0.1	1.0	1.80	1.33
	31	10	0.1	0.0	1.27	1.54
	31	10	0.2	1.0	1.93	> 3
	31	10	0.0	1.0	0.81	> 3

* Todos los medios se constituyeron en agua destilada y contienen además de los ingredientes enumerados, D-Glucosa, 27 gramos por litro; D-Fructosa 3 gramos por litro; NaH₂PO₄·H₂O 0.70 gramos por litro; Na₂HPO₄ 3.34 gramos por litro + 2.445 gramos por litro que se añade a las 17 horas.

** Todos los caldos se diluyeron hasta aproximadamente 750 partes por millón de xantano.

CUADRO II

<u>Puente de Nitrógeno</u>	<u>Ingredientes del Medio</u>	<u>% de Xantano</u>	<u>Relación de Filtro**</u>
Permamina IV	Patente Norteamericana Número 3,391,060	0.8	3 (0.80 micrones)
Materiales Solubles de Destiladores	Patente Norteamericana Número 3,000,790	1.41	3 (0.65 micrones)
NZ-amina YF (2 gramos por litro)	Ejemplo II	0.99	3 (0.65 micrones)
NZ-Soya (2 gramos por litro)	Ejemplo II	0.89	3 (0.65 micrones)

** Todos los caldos se diluyeron hasta aproximadamente 750 partes por millón de xantano

Alternativamente, el procedimiento de añejamiento, se añade un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido de sodio o de potasio al caldo de fermentación final a una concentración de 0.1 a 2.0 por ciento en peso/volumen, de preferencia 0.5 por ciento en peso/volumen, junto con una sal de metal alcalino tal como cloruro o sulfato de sodio o de potasio, a una concentración de 0 a 5 por ciento en peso/volumen, de preferencia de 1.0 por ciento en peso/volumen. La sal preferida es el cloruro de sodio. El caldo se calienta bajo una atmósfera exenta de oxígeno (v. gr., nitrógeno) a una temperatura de 55° a 121°C. de preferencia de 85° a 95°C. El tiempo de calentamiento no es crítico y puede prolongarse durante varias horas. Un período de tiempo práctico es de 1 a 30 minutos, de preferencia de aproximadamente 10 minutos. El caldo se enfría a temperatura ambiente y se ajusta a un pH de 3 a 12, de preferencia un pH de 7, con un ácido tal como ácido clorhídrico. Este tratamiento térmico alcalino hidroliza las células bacterianas sin afectar el contenido del xantano. La desacetilación del xantano ocurre durante este procedimiento y el producto desacetilado es bastante apropiado para usarse en la recuperación de petróleo.

El caldo de fermentación apropiadamente añejado o tratado térmicamente en forma alcalina se diluye por lo general con agua o salmuera hasta una concentración de xantano de aproximadamente 400 a 1000 partes por millón para usarse en la recuperación de petróleo mejorada. Opcionalmente, puede añadirse

un surfactante para mejorar la recuperación de petróleo. Los surfactantes representativos incluyen varios sulfonatos de petróleo bien conocidos por aquellos expertos en el ramo de recuperación de petróleo.

Quedará comprendido que pueden haber condiciones y factores que hagan impráctico o costoso el transporte de grandes volúmenes de caldo de fermentación para inyectarse en los depósitos que contienen petróleo. Para este objeto, se proporciona una composición especial. Al caldo tratado térmicamente en forma alcalina, que se ha descrito anteriormente, se añade un solvente miscible en agua tal como metanol, etanol, acetona, alcohol de butilo terciario, o isopropanol en cantidad suficiente para precipitar la goma de xantano que se separa mediante centrifugación o filtración y se seca. El solvente miscible en agua preferido es isopropanol a una concentración de 20 a 75 por ciento en peso/peso de preferencia de 38 por ciento en peso/peso. La reconstitución con agua o salmuera hasta una concentración de xantano de 100 a 3000 partes por millón, proporciona una composición para la recuperación de petróleo mejorada que es comparable en funcionamiento con aquella de caldo de fermentación entero diluido. Durante el procedimiento de la re-disolución, es importante proporcionar un esfuerzo cortante suficiente para ocasionar una dispersión adecuada del polisacárido y para impedir la formación de aglomerados.

PROCEDIMIENTOS DE PRUEBA

Prueba de Filtrabilidad Millipore

Se preparan 1000 mililitros de una solución de xantano de 750 partes por millón en 500 partes por millón de una solución de sal (10:1 - NaCl:CaCl₂) de la siguiente manera:

En un mezclador de tipo Waring equipado con un recostato, se mide una cantidad de caldo suficiente (basándose en el contenido de xantano) para proporcionar 0.75 gramos de sólidos de xantano. Se diluye de 1 a 6 con una solución de sal. Esta mezcla se somete a esfuerzo cortante de la siguiente manera:

40 por ciento de energía/2 minutos

60 por ciento de energía/2 minutos

80 por ciento de energía/2 minutos

Diluyáse en un mezclador hasta 750 partes por millón de xantano y sométase a esfuerzo cortante a 40 por ciento de la energía durante 2 minutos. (La solución se usa también para la determinación de la viscosidad).

Use una instalación experimental que permita que el régimen de flujo a través de un disco de filtro Millipore (47 milímetros, tamaño de poro de 0.45 a 3.0 micrones) como una función del volumen bajo una presión constante de 2.812 kilogramos por centímetro cuadrado manométrica. Use un depósito que acomode > 1000 mililitros.

Cargue el depósito con un litro de la solución de xantano (750 partes por millón). Gradúe la presión a 2.812

kilogramos por centímetro cuadrado manométrica. Abra la válvula y comience a registrar el volumen del material filtrado y el tiempo (segundos).

$$\text{Relación de Filtro} = \frac{\text{tiempo para recoger la cuarta parte 250 mililitros de solución}}{\text{tiempo para recoger la primera parte de los 250 mililitros de la solución}}$$

Determinación de Viscosidad

Mida la viscosidad con un viscosímetro sincroeléctrico Brookfield, modelo LVT, usando un adaptador UL. Mida la temperatura a 25°C. a 6 y 12 revoluciones por minuto. La viscosidad se expresa en unidades centipoise.

Determinación de Xantano

El xantano altamente purificado contiene aproximadamente 18.4 por ciento de ácido glucurónico. El ácido glucurónico en las composiciones de xantano se determina en ausencia de formaldehído y sin borato a temperatura de 100°C. mediante el método de Knutson and Jeanes, Anal. Biochem., 24 470 (1968); *ibid.*, 482.

$$\% \text{ de Xantano} = \frac{\% \text{ de Acido Glucurónico} \times 100}{18.4}$$

18.4

EJEMPLO I

Las células de Xanthomonas campestris de un cultivo en tubo inclinado de agar YM se trasladaron a 300 mililitros de caldo YM contenido en un matraz Fernbach de capacidad de 2.8 litros y se agitaron en un agitador giratorio durante aproximadamente 31 horas a temperatura de 28°C. Una alícuota de 25 mililitros se trasladó a un matraz Fernbach de 2.8 litros que contenía 500 mililitros de un medio de la siguiente composición:

<u>Ingrediente</u>	<u>Gramos/litro</u>
Glucosa-fructosa (Isosweet 100, Corn Products)	sometido separada- mente a autoclave 10.1
Glucosa cruda (cerelesa)	25.7
NH ₄ NO ₃	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.03
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Acido cítrico anhidro	1.0
K ₂ HPO ₄	4.1
KH ₂ PO ₄	0.69

La cerelesa y el Isosweet 100 se disolvieron en agua destilada y se sometieron a tratamiento en autoclave. El resto de los ingredientes se combinan, se ajustan a un pH de 6.4 y se someten a tratamiento en autoclave. Los materiales

sometidos a tratamiento en autoclave separadamente se combinan luego.

Después de agitarse a temperatura de 28°C. durante aproximadamente 33 horas, una porción de 200 mililitros se trasladada a un fermentador de capacidad de 4 litros, agitado mecánicamente que contiene 2 litros del medio:

<u>In ingrediente</u>		<u>Gramos/litro</u>
Cereales	sometido a tratamiento en autoclave separadamente	25.7
Isosweet 100		10.1
NH_4NO_3		1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.01
Acido cítrico anhidro		1.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.20
Na_2HPO_4		3.34
NaH_2PO_4		0.70

Los azúcares disueltos en 300 mililitros de agua se someten separadamente a tratamiento en autoclave. El resto de los ingredientes disueltos en 1700 mililitros de agua se sometieron a tratamiento en autoclave y las dos soluciones se combinaron luego. La aereación se efectúa a un régimen para proporcionar de 1.5 a 3.5 milimoles de oxígeno por litro por minuto. La fermentación se lleva a cabo a temperatura de 30°C.

durante 48 horas a través de cuyo período de tiempo el pH del medio se mantiene entre 5.9 y 7.5 mediante la adición de una solución amortiguadora de fosfato de sodio constituida con agua de la llave. El ácido etilendiamintetraacético se añade también a la solución amortiguadora de fosfato de sodio para impedir la precipitación de las sales de fosfato de calcio. Al final de la fermentación, la viscosidad del caldo es de >7800 unidades Centipoise (a $6.27 \text{ segundos}^{-1}$ de régimen de esfuerzo cortante) y el rendimiento de xantano es de >1.5 por ciento.

Una solución de control de movilidad tiene una relación de filtro de <1.7 (filtro Millipore de 3.0 micrones).

Una solución de control de movilidad que se prepara a partir de caldo de fermentación entero añejado durante 4 días, tiene una relación de filtro de <1.7 (filtro Millipore de 0.65 micrones).

EJEMPLO II

Se repitió el método del Ejemplo I empleando los siguientes medios de fermentación:

Medio de Inoculo (primera etapa)

<u>In ingrediente</u>		<u>gramos/litro</u>
Cerelesa		10.0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		2.0
KH_2PO_4		1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.5
Nz-Amina YT	pH - 7.0	11.0

Medio de Inoculo (segunda etapa)

<u>In ingrediente</u>		<u>gramos/litro</u>
D-Glucosa	} tratada separadamente en autoclave	27.0
D-Fructosa		3.0
NH_4NO_3		1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.01
Acido cítrico anhidro		1.0
K_2HPO_4		4.1
KH_2PO_4	pH - 6.4	0.69

Medio de Producción

<u>In ingrediente</u>		<u>gramos/litro</u>
D-glucosa	} tratado separadamente en autoclave	27.0
D-fructosa		3.0
Acido cítrico anhidro		1.0

(continuación)

<u>Ingrediente</u>	<u>gramos/litro</u>
NH_4NO_3	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.20
Na_2HPO_4	3.34

pH - 6.4

La fermentación se lleva a cabo tal como en el Ejemplo I, con resultados comparables, con la excepción de que al ajuste del pH se efectúa con una solución de hidróxido de sodio sin la adición simultánea del ácido etilendiamintetraacético.

EJEMPLO III

Se lleva a cabo una fermentación en una escala de la siguiente manera:

Medio de Inoculo (primera etapa)

<u>Ingrediente</u>	<u>Gramos/litro</u>
Cerelesa	10.0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.0
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Nz-Amina YT	11.0

pH - 7.0

El medio se distribuye en porciones de 500 mililitros en dos matraces Fernbach de capacidad de 2.8 litros. Después de someterse a tratamiento en una autoclave y de enfriarse, los matraces se inoculan con células de Xanthomonas campestris. Después de agitarse durante 30 horas a temperatura de 28° C., los dos matraces se combinan y se usan para inocular un fermentador de capacidad de 757 litros que contiene los siguientes ingredientes en 378.500 litros del medio:

Medio de Inóculo (Segunda Etapa)

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (Kg.)</u>
Cerelesa	4.540
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.908
KH ₂ PO ₄	0.454
Sales Epsom	0.227
NZ-Amina YF	4.994

pH - 7.0

El medio de fermentación se agita con un agitador mecánico y se aerea para proporcionar de 1.5 a 3.5 milímetros de oxígeno por litro por minuto. Se añade una solución de hidróxido de sodio a intervalos para mantener el pH a un

valor de 6.0 a 7.5. Se añade aceite de frijol de soya para controlar la espuma excesiva. Después de aproximadamente 48 horas de fermentación, un volumen suficiente para proporcionar un inóculo de 5 por ciento en volumen/volumen se traslada a un fermentador de capacidad de 7,570 litros que contiene 3,028 litros del medio de la siguiente composición:

Medio de Inóculo (Tercera Etapa)

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
NH_4NO_3 (solución al 50 por ciento)	5.034 Litros
K_2HPO_4	12.485 Kg.
KH_2PO_4	2.156 Kg.
Sales Epsom	306 gramos
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	94 gramos
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30.5 gramos
Cerelosa)	79.450 Kg.
Isosweet 100) tratados en autoclave, separadamente	31.780 Kg.
Acido cítrico anhidro	3.064 Kg.

pH - 7.0

Después de fermentarse bajo las condiciones anteriormente descritas durante aproximadamente 31 horas, se traslada un volumen suficiente para proporcionar un inóculo de 10 por ciento en volumen/volumen a un fermentador de capaci-

dad de 7,570 litros que contiene 4,542 litros del siguiente medio:

Medio de Producción

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Cereales)	134.838 Kg.
Isosweet 100) tratados en autoclave, separadamente	53.118 Kg.
NH ₄ NO ₃ (solución al 50 por ciento)	7.570 Litros
Cal hidratada	0.331 Kg.
Acido cítrico anhidro	4.540 Kg.
Na ₂ HPO ₄	15.209 Kg.
NaH ₂ PO ₄	3.178 Kg.
Sales Epsom (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	454 gramos
MnSO ₄ ·H ₂ O	141 gramos
FeSO ₄ ·7H ₂ O	45.4 gramos

pH - 7.0

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

15

20

25

1ª.- Un procedimiento para preparar un caldo de fermentación que contiene el coloide Xanthomonas, apropiado para la preparación de soluciones de control de movilidad usadas en la recuperación de petróleo, caracterizado en que 1) se prepara un medio nutritivo acuoso que comprende un carbohidrato, una fuente de nitrógeno, aproximadamente 0,1 a 10 gramos por litro de un ácido de ciclo Krebs asimilable, aproximadamente 1 a 200 partes por millón de calcio quelado, aproximadamente 0,25 a 20 partes por millón de hierro y elementos vestigiales; y 2) se introduce en el mismo un organismo de Xanthomonas y se airea la mezcla, preferiblemente a una temperatura de alrededor de 30°C, para dar como resultado la fermentación aerobia del Xanthomonas a fin de producir un caldo que contiene aproximadamente 100 a 3.000 partes por millón del coloide de Xanthomonas y que está sustancialmente exento de materia insoluble con

un tamaño de partículas mayor de aproximadamente 3 micrones.

5 2ª.- Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado en que se añade un agente de quelación durante la fermentación en una cantidad de aproximadamente 2 a 20 milimolar, y el agente de quelación es ácido etilendiamintetraacético.

10 3ª.- Un procedimiento de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado en que el ácido de ciclo Krebs es ácido cítrico y la concentración del ácido cítrico en el medio nutritivo es de aproximadamente 0,5 a 2 gramos por litro.

15 4ª.- Un procedimiento de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones que anteceden, caracterizado en que se añade un agente de conservación al caldo después de la fermentación en una cantidad de aproximadamente 200 a 10.000 partes por millón, y este agente de conservación es formaldehído.

20 5ª.- Un procedimiento de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones que anteceden, caracterizado en que la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste de nitrato de amonio, nitrato de sodio y nitrato de potasio.

25 6ª.- Un procedimiento de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones que anteceden, caracterizado

en que el medio nutritivo acuoso se prepara empleando agua que contiene menos de 20 partes por millón de cationes de calcio y otros cationes de fosfato precipitables.

5 7ª.- Un procedimiento para preparar un caldo de fermentación que contiene el coloide Xanthomonas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y seis hojas escritas a máquina por una sola cara.

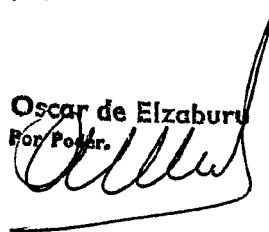
10

Madrid, 01 JUL 1978

P.A.

15

Oscar de Elzaburu
Por Poder.



20

25

28068

JL/