

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningsskrift nr. 127539

Int. Cl. C 12 c 11/08 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 165.501 Inngitt 8.11.1966

Løpedag 30.12.1963

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.7.1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 9.7.1973

Prioritet begjært fra: 31.12.1962 Storbritannia,
nr. 49056/62

Avdelt fra søknad nr. 151.421

The British Petroleum Company Limited,
Britannic House, Moor Lane, London, EC2Y 9BU, England.

Oppfinnere: Charles Vernet, 31, rue Anna Barratin,
St. Germain 78, Yvelines og Jean Antione
Filosa, 6, rue Charles Dupont, Bois
Colombes 92, begge: Frankrike.

Fullmektig: Bryns Patentkontor A/S

Fremgangsmåte til å senke blakningspunktet for et
hydrokarbonrestprodukt oppnådd ved dyrking av en
mikroorganisme.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte til å senke
blakningspunktet for et hydrokarbonrestprodukt oppnådd ved dyrking av
en mikroorganisme.

Tilstedeværelsen av rettkjededede hydrokarboner i hydrokarbon-
råstoffer, som består av slike rettkjededede hydrokarboner og andre
hydrokarboner, er uegnet blant annet fordi slike rettkjededede hydro-
karboner forårsaker relativt høye helle- og blakningspunkter. Vanlig-
vis har slike råstoffers blaknings- og hellepunkt blitt forbedret ved
hjelp av forskjellige kjemiske eller fysikalske behandlingsmetoder,
f.eks. ved dypkjøling. De produkter som er befridd for rettkjededede
hydrokarboner ifølge disse kjente metoder har følgelig ikke represen-
tert noen problemer når det gjelder blakningspunktet.

127539

Det er også kjent å fjerne fra hydrokarbonråstoffer, som består av blandinger av rettkjedede hydrokarboner og andre hydrokarboner, de rettkjedede hydrokarbonene ved mikrobiologisk avvoksing, dvs. selektiv fjerning av rettkjedede hydrokarboner ifølge mikrobiologiske avvokningsmetoder, f.eks. slik som beskrevet i fransk patent nr. 1297 617. Ved mikrobiologisk avvoksing av hydrokarbonblandingene har man imidlertid gjort den overraskende oppdagelse at disse avvoksede produkter har problemer i forbindelse med blakningspunktet til tross for at hydrokarbonproduktet er befridd for rettkjedede hydrokarboner. Den mikrobiologiske fjerningen av de rettkjedede hydrokarbonene har således riktignok gitt den forventede senkingen av det laveste hellepunktet, men har ikke gitt opphav til den forventede tilsvarende senkingen av blakningspunktet. Det må ansees for å være overraskende at et problem med blakningspunktet foreligger i forbindelse med mikrobiologisk avvoksede råstoffer ettersom man ved de vanlige metoder for fjerning av de rettkjedede hydrokarbonene eller voksene alltid har oppnådd en forbedring av blakningspunktet samtidig med forbedringen av det laveste hellepunktet.

Det spesielle og nye problem som følgelig har oppstått med hensyn til hydrokarbonprodukter som er befridd for rettkjedede hydrokarboner ifølge mikrobiologiske avvokningsmetoder, er således å tilveiebringe en fremgangsmåte for å forbedre blakningspunktet til et slikt mikrobiologisk avvokset hydrokarbonprodukt. Formålet med foreliggende oppfinnelse er å løse dette problem og forbedre blakningspunktet hos slike hydrokarbonprodukter som er avvokset ved hjelp av mikrobiologiske metoder.

Foreliggende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte til å senke blakningspunktet for et hydrokarbonrestprodukt oppnådd ved dyrking av en mikroorganisme, hvilket produkt har et nedsatt innhold av eller er helt fri for rettkjedede hydrokarboner og er utvunnet ved dyrking av mikroorganismer i nærvær av en næringsmiddel-vannopløsning, en gass inneholdende fritt oksygen og et hydrokarbonråstoff, som består av en blanding av rettkjedede hydrokarboner og andre hydrokarboner og hvis rettkjedede hydrokarboner fortrinnsvis har en midlere molekylvekt tilsvarende minst 10 karbonatomer per molekyl. Denne fremgangsmåte er kjennetegnet ved at hydrokarbonrestproduktet utsettes for en kaustisk vasking. Det har nemlig helt overraskende vist seg at en kaustisk vasking leder til en forbedring av blakningspunktet.

Det er naturligvis kjent å benytte kaustisk vasking innen petroleuminndustrien, men den kjente anvendelse av kaustisk vasking skjer for å forbedre fargen til hydrokarbonfraksjoner som er avvokset ad kjemisk vei (kfr. f.eks. "Petroleum Processing Handbook", Bland and Davidson, New York, 1967, side 3-61 og side 14-18). Den kjente kaustiske vasking har således blitt benyttet for å forbedre fargen hos kjemisk avvoksede produkter som på grunn av den kjemiske avvoksing ikke er forbundet med noen problemer hva angår blakningspunktet. I foreliggende oppfinnelse benyttes kaustisk vasking imidlertid for å forbedre blakningspunktet og det må ansees for å være overraskende at det nye blakningspunkt-problemet ved mikrobiologisk avvoksing av hydrokarbonprodukter kan løses ved hjelp av kaustisk vasking, som vanligvis benyttes for å forbedre fargen på produkter som er avvokset ved hjelp av kjemiske metoder.

Undersøkelser har vist at den mikrobiologiske avvoksing av hydrokarbonblandingen gir opphav til dannelse av karbon-, hydrogen- og oksygenholdige biprodukter, f.eks. estere, som er årsaken til det utillatelig høye blakningspunktet hos de mikrobiologisk avvoksede hydrokarbonrestprodukter. Disse biprodukter fjernes eller omdannes til mindre skadelige produkter ved den kaustiske vasking ifølge foreliggende oppfinnelse.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse kan benyttes på hydrokarbonrestprodukter som er oppnådd ved dyrking av de nevnte mikroorganismene på et hydrokarbonråstoff, som kan utgjøres av en hydrokarbonfraksjon som er oppnådd fra petroleum og som består av en blanding av rettkjededede hydrokarboner og andre hydrokarboner. De rettkjededede hydrokarbonene inngår vanligvis i form av paraffiner, men kan være tilstede som olefiner eller som en blanding av rettkjededede paraffiner og olefiner.

Egnede råstoffer ved den mikrobiologiske avvoksingen omfatter bensin, gassoljer og smøreoljer; disse råstoffer kan være uraffinerte eller kan ha vært underkastet en viss raffineringsbehandling, men råstoffene må vanligvis inneholde en viss mengde rettkjededede hydrokarboner, hensiktsmessig 3 - 45 vektprosent rettkjededede hydrokarboner.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan utøves på mikrobiologisk avvoksede hydrokarbonprodukter, som er avvokset ved hjelp av mikroorganismer, f.eks. gjærsopper, muggsopper eller bakterier.

Når en gjærsort benyttes ved den mikrobiologiske avvoksingen,

127539

er denne fortrinnsvis fra familien Cryptococcaceae og spesielt underfamilien Cryptococcoideae. Man kan eventuelt benytte f.eks. askospore-dannende gjærtyper fra underfamilien Saccharomycoidae. Foretrukne slekter i familien Cryptococcoideae er *Torulopsis* (også kjent som *Torula*) og *Candida*. Foretrukne gjærstammer er de som er angitt i det nedenstående. Det er spesielt foretrukket å benytte den spesielle kultur som er angitt med et referansenummer; disse referansenummere henviser til CBS-kulturer, som oppbevares av Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, Baarn, Nederland.

<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	CBS 599
<i>Candida</i>	<i>pulcherrima</i>	CBS 610
<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	CBS 890
<i>Candida</i>	<i>utilis</i> , <i>Variati major</i>	CBS 841
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	CBS 2317
<i>Torulopsis</i>	<i>colliculose</i>	CBS 133
<i>Hansenula</i>	<i>anomala</i>	CBS 110
<i>Oidium</i>	<i>lactis</i>	
<i>Neurospora</i>	<i>sitophila</i>	

Av de ovenfor angitte er *Candida lipolytica* spesielt foretrukket.

Mikroorganismen kan eventuelt være en muggsopp. En egnet mugg er *Penicillium expansum*.

Mikroorganismen kan imidlertid også utgjøres av en bakterie. Egnede bakterier finnes innen ordnene *Pseudomonadales*, *Eubacteriales* og *Actinomycetales*.

De bakterier som benyttes tilhører fortrinnsvis familien *Bacillaceae* og *Pseudomonadaceae*. Foretrukne arter er *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* og *Pseudomonas aeruginosa*. Andre brukbare stammer omfatter:

- Bacillus amylobacter*
- Pseudomonas natriegens*
- Arthrobacter* sp.
- Micrococcus* sp.
- Corynebacterium michiganense* sp.
- Pseudomonas syringae*
- Xanthomonas begoniae*
- Flavobacterium devorans*
- Acetobacter* sp.
- Actinomyces* sp.

Egnede muggsopper finnes i familien Aspergillaceae. En egnet slekt er *Penicillium*, fortrinnsvis benyttes *Penicillium expansum*. En annen egnet slekt er *Aspergillus*.

Vanligvis utføres dyrkingen i nærvær av en vannoppløsning av et næringsmiddel. Visse faste næringsmidler kan eventuelt benyttes. I hvert tilfelle må man tilføre en gass som inneholder fritt oksygen.

Penicillium expansum er egnet for dyrking i en vannoppløsning, som inneholder et næringsmiddel og hydrokarboner.

Penicillium roqueforti, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fussigatus*, *Aspergillus niger* og *Aspergillus versicolor* kan benyttes for dyrking på et fast middel som inneholder hydrokarboner som råstoff.

For mikroorganismens vekst ved den mikrobiologiske avvoksing er det nødvendig at man i tillegg til råstoffet tilfører en vannoppløsning av et næringsmiddel og oksygen, fortrinnsvis i form av luft.

Mikroorganismens vekst fremmes dersom man til dyrkningsmediet tilsetter en meget liten mengde gjærekstrakt (et industriprodukt som har et høyt innhold av vitaminer fra B-gruppen og som er oppnådd ved hydrolyse av en gjærsort eller mer generelt vitaminer fra B-gruppen og/eller biotin). Denne mengde er fortrinnsvis av størrelsesorden 25 ppm beregnet på det vannholdige fermenteringsmedium. Mengden kan være større eller mindre avhengig av de valgte vekstbetingelser.

Mikroorganismens vekst skjer på bekostning av råstoff-fraksjonen med mellomliggende dannelselse av elementer med syrefunksjon, spesielt fettsyrer, på en slik måte at dyrkningsmediets pH-verdi progressivt senkes. Dersom pH-verdien ikke tilbakestilles stoppes veksten temmelig hurtig og mikroorganismens konsentrasjon i mediet eller cellekonsentrasjonen øker ikke lenger og derfor oppnåes en såkalt stasjonær fase.

Dyrkningsmediet holdes derfor fortrinnsvis ved den ønskede pH-verdi gjennom trinnvis eller kontinuerlig tilsetning av et vannholdig medium med høy pH-verdi. Når man anvender muggsopp eller gjær-sopp og særlig *Candida lipolytica*, skal dyrkningsmediets pH-verdi vanligvis holdes i området 3 - 6 og fortrinnsvis 4 - 5 (bakterier krever en høyere pH-verdi som vanligvis ligger i området 6.5 - 8). Egnede alkaliske materialer for tilsetning til vekstblandingen omfatter natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, dinatriumhydrogenfosfat og ammoniakk, enten fri eller i vandig oppløsning.

Vekstblandingsens optimale temperatur vil variere avhengig av

127539

den benyttede type av mikroorganisme og vil vanligvis ligge i området 25° - 35°C . Når *Candida lipolytica* anvendes er det foretrukne temperaturområdet 28° - 32°C .

Oksygenopptaket er vesentlig for mikroorganismens vekst. For å opprettholde en hurtig vekst bør den for tilførsel av oksygen benyttede luft være tilstede i form av fine bobler under omrøringsvirkning. Luften kan innføres gjennom en sintret overflate. Man kan eventuelt benytte det system som er kjent som "hvirvellufting" for nøyaktig lufting.

Ved anvendelse av gjær fra stammen *Candida lipolytica* og lufting i form av "hvirvellufting" oppnår man en hurtig veksthastighet slik at utviklingstiden eller forøkningsstiden ligger i området 2 - 5 timer og cellekonsentrasjonen økes med en faktor på opptil 12 på 2 døgn.

Ved satsvis drift vil mikroorganismen vanligvis først vokse med en lav cellekonsentrasjons-forøkningshastighet (denne vekstperiode betegnes "latensfasen"). Deretter øker veksthastigheten i en viss periode som betegnes "eksponensialfasen", og deretter blir cellekonsentrasjonen på ny konstant (den "stasjonære fasen").

Vekstoperasjonen vil vanligvis avbrytes før den stasjonære fasen.

Ved dette stadium fraskilles organismen vanligvis fra hoveddelen av den ikke-fortrukne råstoff-fraksjon.

Ved å sentrifugere det produkt som kommer fra gjæringsbeholderen kan tre fraksjoner utvinnes. Disse er i rekkefølge av økende spesifikk vekt følgende:

- I) en oljefase, som inneholder gjærceller,
- II) en vannfase som inneholder spor av olje og gjær, og
- III) en gjærkrem som består av gjær og i hvilken en viss mengde olje og vannfase er festet til cellene.

Etter utvinning av fraksjon II kan de gjenværende fraksjoner I og III blandes på nytt og blandes med en vannopløsning av et overflateaktivt middel, hensiktsmessig et spiselig overflateaktivt middel slik som saccaroseester.

Formålet med denne behandling er å fraskille oljen fra gjærcellene; oljen fastholdes tydeligvis på cellene ved adsorpsjon.

Den således dannede emulsjon nedbrytes ved sentrifugering for å oppnå tre fraksjoner:

- IV) en oljefase,
- V) en vannfase som inneholder overflateaktivt middel og som tilbakesendes for behandling av fraksjonene I og III, og

127539

VI) en gjærkrem som inneholder gjær, som fremdeles er forurenset med olje og en overflateaktivt middel inneholdende vannfase.

For i størst mulig utstrekning å minske forbruket av det overflateaktive produkt tilbakesettes den vannholdige vaskeoppløsning som inneholder dette.

Det utvunnede, ikke-metaboliserte hydrokarbon (dvs. fraksjonene I og IV) utsettes, eventuelt etter en forutgående raffinering, for en kaustisk vasking ifølge foreliggende oppfinnelse.

Foretrukne materialer for utførelse av den kaustiske vasking er vannoppløsninger og alkoholoppløsninger av natriumhydroksyd eller kaliumhydroksyd.

Om ønskelig utføres den kaustiske vasking med en 30 - 50 vektprosent vannoppløsning av alkaliet, hvorved volumforholdet mellom hydrokarbon og behandlingsmedium ligger i området fra 1:1 til 1:5.

Den kaustiske vasking kan eventuelt utføres med en 15 - 25 vektprosent alkoholoppløsning av et alkalimetallhydroksyd hvorved volumforholdet mellom hydrokarbon og behandlingsmedium ligger i området fra 2:1 til 1:2.

Den kaustiske vasking utføres fortrinnsvis under omrøring.

Temperaturen ved den kaustiske vasking skal vanligvis ligge i området 60° - 100°C .

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen. I disse eksempler er celletettheten uttrykt som tørrvekt gjær per liter kultur.

Eksempel 1

40 liter av et mineralnæringsmedium på vannbasis med den i det følgende angitte sammensetning, ble innført i en gjæringsbeholder bestående av rustfritt stål og som hadde en effektiv kapasitet på 60 l.

For å holde temperaturen i gjæringsbeholderen konstant ved 30°C ble vann sirkulert gjennom en ringformet kappe mellom to konsentriske sylindere, hvorved den minste sylindere var selve gjæringsbeholderen.

Det benyttede næringsmediet på vannbasis hadde sammensetningen:

diammoniumfosfat	2 g
kaliumklorid	1.15 g
magnesiumsulfat, 7 H ₂ O	0.65 g
sinksulfat	0.17 g
mangansulfat 1 H ₂ O	0.045 g
jern(II)sulfat 7 H ₂ O	0.068 g

127539

gjærekstrakt	0.025 g
vannledningsvann	200 g
destillert vann	til 1000 ml

20 liter podningskultur fra en 24 timers kultur av *Candida lipolytica* på blandede C_9 - C_{16} -n-paraffinhydrokarboner ble deretter tilsatt slik at celletettheten ble omtrent 1 g/l.

1.03 liter tung gassolje (15 g/l gjæringsmedium) ble innført i gjæringsbeholderen, hvilket er tilstrekkelig for å bringe celletettheten til 2 g/l.

Kulturens temperatur ble innstilt ved $30 \pm 1^\circ\text{C}$, mens pH-verdien ble stilt til pH 4 og luftingen og omrøringen innstilt slik at luftingsforholdet var 3 millimol O_2 per liter medium og per minutt. En automatisk pH-regulator tilsatte 10N ammoniakk.

Når ammoniakkstrømmen nådde 20 ml ble den satsvise tilsetning av gassolje igangsatt med en hastighet som ble bestemt av de teoretiske behov for kulturen under antagelse av et utbytte på 10 %.

$(100 \times \frac{\text{tørrvekt av dannet gjær}}{\text{nødvendig gassolje}})$ og en celledelingstid på 3 timer.

Denne tilsetning ble foretatt hver time til totalt 250 g/l gassolje var tilsatt, dvs. 17 liter.

Etter å ha vært 2 g/l ved begynnelsen ble celletettheten 18 g/l etter 25 timer (ved slutten av eksponensialvekstfasen).

Egenskapene til den tunge gassoljen var følgende:

Spesifikk vekt $15^\circ\text{C}/4^\circ\text{C}$	0.876 g/cm ³
Flammepunkt (Afnor)	>120°C
Blakningspunkt	+20°C
Laveste hellepunkt	+18°C
Innhold av n-paraffiner	10 vektprosent

Sayboldestillasjon:

Begynnelseskokepunkt	221°C
5 %	228°C
50 %	363°C
95 %	402°C
Sluttkokepunkt	>405°C
Rest	11 volumprosent
Tap	0 volumprosent

Fra gjæringsbeholderen ble det etter 25 timer fjernet en viss mengde kultur fra hvilken 300 ml ikke-metabolisert gassolje ble opp-

127539

nådd ved sentrifugering ved $+50^{\circ}\text{C}$. Denne resterende gassoljes egenskaper var:

Spesifikk vekt $15^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}$	0.8939 g/cm^3
Flammepunkt (Afnor)	$>120^{\circ}\text{C}$
Blakningspunkt	0°C
Laveste hellepunkt	-16°C
Innhold av n-paraffiner	1.8 vektprosent

Sayboltdestillasjon:

Begynnelseskokepunkt	245°C
5 %	296°C
50 %	365°C
95 %	402°C
Sluttkokepunkt	$>405^{\circ}\text{C}$

Rest	1 volumprosent
Tap	0 volumprosent

300 ml av den ikke-metaboliserte gassoljen og 300 ml av en 20 vektprosent alkoholoppløsning av kaustisk kaliumkarbonat ble innført i en 100 ml's kolbe med rund bunn som var forsynt med en tilbake-løpskjøler, og blandingen ble kokt under tilbakeløp i 2 timer. Den behandlede gassolje fjernes ved dekantering. Gassoljens blakningspunkt var senket fra 0°C til -16°C .

Eksempel 2

Det i eksempel 1 angitte forsøk ble foretatt med en gassolje fra en kontinuerlig dyrking av *Candida lipolytica*.

3 liter av en kontinuerlig dyrking i en 5-liters gjæringsbeholder ble tilført 300 ml/time av et medium som inneholdt 10 % av en tung gassolje, som var emulgert i 90 % av det i eksempel 1 angitte mineralmedium. Den tilførte gassoljes egenskaper var følgende:

Spesifikk vekt	$0.875 \text{ g}/\text{cm}^3$
Laveste hellepunkt	$+17^{\circ}\text{C}$
Blakningspunkt	$+20^{\circ}\text{C}$
Svovelinhold	1.6 vektprosent
Innhold av n-paraffiner	12 vektprosent
Flammepunkt (Afnor)	135°C

Sayboltdestillasjon:

Begynnelseskokepunkt	139°C
5 %	304°C
50 %	362°C
95 %	398°C

127539

Sluttkokepunkt	>400°C
Rest	1 volumprosent
Tap	0 volumprosent

Ved automatisk tilsetning av 10N ammoniakk ble pH-verdien holdt ved pH 4 $\pm$ 0.1. Temperaturen ble holdt ved 30°C og luftingen og omrøringen ble utført på en slik måte at luftingsforholdet var 3 millimol oksygen per liter og per minutt.

Etter noen dager ble celltettheten stabilisert ved 10 $\pm$ 1 g/l og tilstrekkelig med kultur ble deretter fjernet for å oppnå 300 ml resterende gassolje ved sentrifugering ved +5°C. Den ikke-metaboliserte gassoljes egenskaper var følgende:

Spesifikk vekt 15°C/4°C	0.891 g/cm ³
Laveste hellepunkt	-8°C
Blakningspunkt	+20°C
Svovelinhold	1.86 vektprosent
Innhold av n-paraffiner	1.6 vektprosent
Flammepunkt (Afnor)	147°C

Sayboltdestillasjon:

Begynnelseskokepunkt	260°C
5 %	306°C
50 %	364°C
95 %	398°C
Sluttkokepunkt	>400°C
Rest	1 volumprosent
Tap	0 volumprosent

Denne ikke-metaboliserte gassolje ble behandlet ved kaustisk vasking på den måte som er beskrevet i eksempel 1. Gassoljens blakningspunkt ble senket fra +20°C til -6°C.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte til å senke blakningspunktet for et ved dyrking av en mikroorganisme oppnådd hydrokarbonrestprodukt, som har et nedsatt innhold av eller er fritt for rettkjededede hydrokarboner og som er utvunnet ved dyrking av mikroorganismer i nærvær av en næringsmediumvannopløsning, en gass inneholdende fritt oksygen og et hydrokarbonråstoff, som består av en blanding av rettkjededede hydrokarboner og andre hydrokarboner og hvis rettkjededede hydrokarboner fortrinnsvis har en midlere molekylvekt tilsvarende minst 10 karbonatomer per molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at hydrokarbonrestproduktet utsettes for en kaustisk vasking.

Anførte publikasjoner:

Fransk patent nr. 1297619