

NORGE



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Utlegningsskrift nr. 127540

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

Patentsøknad nr. 165.503 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. 49057/62

Avdelt fra søknad nr. 151.421

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

Oppfinner: Jean Antoine Filosa, 6, Rue Charles Dupont,
Bois Colombes 92, Frankrike.

Fullmektig: Bryns Patentkontor A/S

Fremgangsmåte til fremstilling av et gjærprodukt.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte til fremstilling av et gjærprodukt ved dyrkning på hydrokarboner, idet man samtidig kan få en hel eller delvis fjerning av rettkjededede hydrokarboner fra blandinger av disse med andre hydrokarboner.

Når gjær dyrkes i nærvær av et hydrokarbon, er det funnet at gjæren kan være forurensset av adsorberte hydrokarboner. Andre materialer som er dannet i fermenteringsprosessen, kan noen ganger være tilstede, således kan gjæren være forurensset av lipider.

Det er nå funnet at disse forurensninger eller en del av disse under visse betingelser vil danne en næringskilde for gjæren hvorved mengden av forurensningene kan reduseres.

127540

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt en fremgangsmåte til fremstilling av et gjærprodukt hvor en gjær under veksttrinnet dyrkes i nærvær av en hydrokarbonblanding bestående helt eller delvis av rettkjededede hydrokarboner, et vandig næringsmedium og en gass inneholdende fritt oksygen, og deretter, om nødvendig, fra-skilles hovedmengden av ikke forbrukt hydrokarbon hvorved det oppnåes en gjær som bare inneholder en liten mengde hydrokarbon som forurensning, og denne fremgangsmåte er kjennetegnet ved at gjæren deretter i et rensetrinn dyrkes i et vandig næringsmedium og i nærvær av en gass inneholdende fritt oksygen uten tilførsel av hydrokarbonblanding, hvorved det hydrokarbon som forurenses mikroorganismen, og biprodukter som er dannet under dyrkingen, reduseres i mengde eller elimineres.

I foreliggende fremgangsmåte anvendes det således et rensetrinn etter det normale veksttrinnet. En slik fremgangsmåte er spesielt nyttig når råmaterialet er en kompleks hydrokarbonblanding inneholdende bestanddeler som er metabolisert i forskjellig utstrekning, f.eks. en petroleumfraksjon. Siden slike blandinger kan inneholde 90 % av bestanddeler som er ikke-metaboliserbare under betingelsene i hoveddyrkingstrinnet, er et ytterligere rensningstrinn ikke særlig nyttig.

Ved det angitte rensetrinnet får man fjernet lipider, estere, ketoner og/eller fettsyrer, eller man får redusert mengden av disse stoffer i gjæren.

Hydrokarbonblandingen inneholder fortrinnsvis C_{10} eller høyere hydrokarboner. Det kan hensiktsmessig brukes en hydrokarbonfraksjon som er avledet fra petroleum.

Det er velkjent at visse petroleumfraksjoner, spesielt gassoljer, inneholder rettkjededede hydrokarboner, hovedsakelig paraffiner, som er vokser, og som har en skadelig virkning på fraksjonens hellepunkt; dvs. når disse hydrokarboner fjernes helt eller delvis, senkes fraksjonens hellepunkt. Voksen fjernes i alminnelighet ved bunnfelling ved hjelp av oppløsningsmidler, idet voksen som opprinnelig er tilstede i fraksjonen gjenvinnes som sådan, dvs. uten omdannelse til mer verdifulle produkter.

Petroleumfraksjonene som koker under gassoljene, f.eks. tunge naftener og kerosener, inneholder også rettkjededede hydrokarboner som er potensielt verdifulle for omdannelse til andre produkter; men hittil har en generell utnyttelse av disse hydrokarboner blitt vanskelig gjort på grunn av nødvendigheten av å gjenvinne disse hydrokarboner

fra petroleumfraksjonene, i hvilke de befinner seg, før de kan omdannes til andre produkter.

Ved dyrkning av en gjær på den ovenfor beskrevne måte i nærvær av en petroleumfraksjon som delvis består av rettkjedede hydrokarboner og som har en gjennomsnittlig molekylvekt som tilsvarer minst 10 karbonatomer per molekyl, og i nærvær av et vandig næringsmedium; og i nærvær av en gass inneholdende fritt oksygen, får man på den ene side et mikroorganismeprodukt og på den annen side en petroleumfraksjon som har en redusert mengde rettkjedede hydrokarboner eller som er fri for disse.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er spesielt verdifull for behandling av petroleumgass-oljefraksjoner som inneholder rettkjedede hydrokarboner i form av vokser, fordi det ved prosessen ifølge oppfinnelsen oppnås en gassolje med forbedret hellepunkt mens voksene omdannes til et verdifullt produkt.

De rettkjedede hydrokarboner vil vanligvis være tilstede i blandingen som paraffiner; disse hydrokarboner kan imidlertid være tilstede som olefiner, og det kan også brukes en blanding inneholdende rettkjedede paraffiner og olefiner.

Når gjær dyrkes i nærvær av de ovenfor beskrevne blandinger under betingelser som fremmer gjærveksten på bekostning av de rettkjedede hydrokarboner, blir de andre hydrokarboner, f.eks. isoparaffiner, naftener og aromatiske forbindelser ikke metabolisert eller den mengde som metaboliseres er i ethvertfall meget liten. Videre, til forskjell fra konvensjonelle kjemiske prosesser som styres av massevirkningsloven, blir hastigheten med hvilken rettkjedede hydrokarboner fjernes ikke vesentlig redusert ettersom mengden av disse hydrokarboner i den totale blanding av hydrokarboner minsker, (unntatt i de endelige fjerningstrinn).

Således kan den prosentvise omdannelse av rettkjedede hydrokarboner som oppnås om ønsket holdes ved en verdi i nærheten av 100 % uten å nødvendiggjøre et meget uforholdsmessig forbruk av kontaktid for å oppnå små forbedringer. Dessuten kan denne høye prosentvise omdannelse i den kontinuerlige prosess oppnås uten å ty til bruk av en lang reaksjonsbane.

Ved anvendelse av denne prosess under betingelser som begrenser metabolismeringen av de rettkjedede hydrokarboner, er det mulig å operere med fjerning av bare en ønsket mengde av disse hydrokarboner.

127540

Egnede råmaterialer omfatter kerosen, gassoljer og smøreoljer; disse kan være uraffinerte eller kan ha gjennomgått en viss raffineringsbehandling, men må i alminnelighet inneholde en mengde rettkjedede hydrokarboner for å oppfylle oppfinnelsens formål. Petroleumfraksjonen inneholder helst 3 - 45 vektprosent rettkjedede hydrokarboner.

Den anvendte gjær er fortrinnsvis fra familien *Cryptococcaceae* og spesielt fra underfamilien *Cryptococcoidae*; om ønsket kan det imidlertid brukes *ascosporogene* gjær fra familien *Saccharomycoidae*. Foretrukne slekter av *Cryptococcoidae*-familien er *Torulopsis* (også kjent som *Torula*) og *Candida*. Foretrukne gjærstammer er som følger. Det er spesielt foretrukket å bruke de spesielle kulturer med de nedenfor nevnte deponeringsbetegnelser, idet disse refererer seg til CBS-samlingen hos Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, Baarn, Holland og INRA-samlingen hos Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Frankrike.

<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> , Variati major	CBS 841
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	CBS 2317
<i>Torulopsis</i>	<i>colliculosa</i>	CBS 133
<i>Hansenula</i>	<i>anomala</i>	CBS 110
<i>Mycoderma</i>	<i>gancoillote</i>	INRA; STV 11.

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

Dyrkingen utføres som nevnt i nærvær av et vandig næringsmedium, men om ønsket kan man benytte visse faste næringsstoffer.

I hvert tilfelle må det tilveiebringes en gass inneholdende fritt oksygen.

Et egnet næringsmedium for gjær har sammensetningen:

Diammoniumfosfat	2 g
Kaliumklorid	1.15 g
Magnesiumsulfat, 7H ₂ O	0.65 g
Sinksulfat	0.17 g
Mangansulfat, 1H ₂ O	0.045 g
Ferrosulfat, 7H ₂ O	0.068 g
Vannledningsvann	200 ml

127540

Gjærekstrakt

0.025 g

Destillert vann (for å fylle opp til 1000 ml).

Mikroorganismer og spesielt gjær har, når de dyrkes direkte på hydrokarbonblandinger, noen ganger vanskelig for å vokse, og det er noen ganger nødvendig å bruke et podningsmateriale av en mikroorganisme som tidligere er tilpasset vekst på hydrokarbonfraksjonen som det er meningen å bruke. Videre kan mikroorganismen, selv om den dyrkes i nærvær av et vandig mineralsaltholdig medium inneholdende de riktige næringselementer, ha vanskelig for å vokse fordi hydrokarbonfraksjonen ikke inneholder de vekstfaktorer som forekommer i karbohydrat-råmaterialer med mindre disse vekstfaktorer tilsettes.

Veksten av gjæren fremmes ved tilsetning til kulturmediet av en meget liten mengde gjærekstrakt (et industrielt produkt som er rikt på B-vitaminer tilveiebragt ved hydrolyse av en gjær) eller mer generelt B-vitaminer og/eller biotin. Denne mengde er fortrinnsvis av størrelsesorden 25 deler per million med hensyn til det vandige fermenteringsmedium. Den kan være høyere eller lavere i overensstemmelse med de valgte vekstbetingelser.

Veksten av gjæren finner sted på bekostning av hydrokarbonene med mellomliggende dannelse av stoffer som har en sur virkning, hovedsakelig fettsyrer, på en slik måte at pH-verdien i det vandige mineralmedium progressivt minker. Hvis man ikke korrigerer dette, stanses veksten temmelig raskt og konsentrasjonen av mikroorganismen i mediet, dvs. celletettheten, øker ikke lenger, og det dannes således en såkalt stasjonær fase.

Det vandige næringsmedium holdes derfor fortrinnsvis ved en ønsket pH-verdi ved trinnvis eller kontinuerlig tilsetning av et vandig medium med høy pH-verdi. Når man benytter gjær og spesielt når *Candida lipolytica* anvendes, holdes pH-verdien i næringsmediet vanligvis i området 3 - 6 og fortrinnsvis i området 4 - 5. Egnede alkaliske materialer for tilsetning til vekstblandingen omfatter natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, dinatriumhydrogenfosfat og ammoniakk, enten fri eller i vandig oppløsning.

Den optimale temperatur for vekstblandingen vil variere i overensstemmelse med den type gjær som benyttes og ligger vanligvis i området 25° til 35°C. Ved bruk av *Candida lipolytica* er det foretrukne temperaturområdet 28° - 32°C.

Oksygenopptaket er essensielt for gjærens vekst. Oksygenet

127540

tilveiebringes i alminnelighet som luft. For å opprettholde en høy veksthastighet bør luften, som gir oksygen, være tilstede i form av fine bobler under omrøring. Luften kan innføres gjennom en sintret overflate. Et intimt gjennomluftningssystem kjent som "hvirvelgjennomluftning" kan imidlertid brukes.

Det er funnet at ved bruk av gjær fra stammen *Candida lipolytica* i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, hvor gjennomlufting bevirkes ved hjelp av "hvirvelgjennomlufting", oppnås en høy veksthastighet hvorved utviklingstiden ligger i området 2 til 5 timer og cellekonsentrasjonen økes med en faktor på opptil 12 på 2 dager.

I porsjonsvis operasjon vil mikroorganismen innledningsvis vokse med en lav celletetthetsøkning. (Denne vekstperiode kalles "latensfasen"). Etter dette vil veksthastigheten øke til en høyere veksthastighet, og denne periode kalles "eksponensialfasen" og deretter vil igjen celletettheten bli konstant (den "stasjonære fase").

Et forråd av mikroorganismen for å starte neste porsjon fjernes fortrinnsvis før slutten på eksponensialfasen. Veksten vil i alminnelighet bli stoppet før den stasjonære fase.

På dette trinn separeres mikroorganismen fra hovedmassen av den ubrukte hydrokarbonblanding.

Ifølge en metode for behandling av produktet separeres først størstedelen av den kontinuerlige vandige fase, og dette utføres fortrinnsvis ved hjelp av sentrifugering eller dekantering. Den separerte vandige fase inneholder i alminnelighet en større konsentrasjon ikke-næringsdyktige ioner enn det som kan tolereres i resirkuleringsstrømmen, og når dette er tilfelle, kan bare en del av den gjenvundne vandige fase resirkuleres. Det vil således vanligvis være mulig å separere ca. 96 vektprosent av den vandige fase som er tilstede i produktet, av hvilket, på samme prosentbasis, ca. 20 vektprosent vil bli kassert. Resirkuleringsstrømmen tilføres supplerende mengder av de nødvendige næringsselementer og returneres til fermenteren, og om ønsket kan de supplerende materialer tilføres til fermenteren som en separat strøm.

Ved å sentrifugere produktet fra fermenteren (fortrinnsvis etter den beskrevne dekantering) gjenvinnes tre fraksjoner. Disse er i rekkefølge av økende spesifikk vekt:

- (1) en oljefase inneholdende mikroorganismeceller,
- (2) en vandig fase inneholdende spor av oljer og mikroorganismer, og

127540

- (3) en mikroorganisme - "krem" bestående av mikroorganismer, som har en mengde olje fastholdt til cellene, sammen med vandig fase.

Fraksjon (3) vil deretter bli blandet med et vandig næringsmedium, som kan være det samme som eller forskjellig fra det vandige næringsmedium benyttet i veksttrinnet, og holdes i kontakt med en gass inneholdende fritt oksygen, hvorved hydrokarbonet som forurenser mikroorganismen reduseres i mengde eller elimineres.

Størstedelen av den kontinuerlige vandige fase blir igjen fortrinnsvis fraskilt med resirkulering av en del av den gjenvundne vandige fase, som beskrevet; resirkuleringen kan enten være til veksttrinnet eller til rensetrinnet som beskrevet.

Ved å sentrifugere produktet fra fermenteren, fortrinnsvis etter separering av størstedelen av den vandige fase ved dekantering, oppnås:

- (1) en vandig fase inneholdende spor av mikroorganismer,
- (2) en mikroorganisme-krem.

Om nødvendig kan denne krem videre behandles for fjerning av spor av olje, som kan være festet til cellene. For dette formål kan mikroorganismekremen vaskes med en vandig oppløsning av et overflateaktivt middel og deretter med vann. Til slutt kan gjærentørkes under betingelser som er egnet for dens senere bruk som en matvare.

Produktet som oppnås på slutten av veksttrinnet kan om ønsket viderebehandles uten tilsetning av hydrokarbonblanding, men med kontinuerlig blanding (i et rensetrinn) med en gass inneholdende fritt oksygen, hvorved forurensninger i mikroorganismen reduseres i mengde eller elimineres. Mikroorganismen kan gjenvinnes etter rensetrinnet som beskrevet tidligere.

Prosessen kan drives kontinuerlig eller porsjonsvis.

Under kontinuerlig drift vil det i alminnelighet være nødvendig å tilveiebringe separate fermenteringsapparater eller separate soner i samme apparat for vekst og rensetrinn.

Foretrukne metoder til bruk ved dyrking av mikroorganismen og til gjenvinning av produktet er beskrevet i britiske patenter nr. 914 567, 1 021 697, 1 021 698, 1 049 065, 1 059 881, 1 059 882, 1 059 883, 1 059 884, 1 059 885, 1 059 887, 1 059 888, 1 059 889, 1 059 890, 1 095 182 og 1 095 183, samt i fransk patent nr. 1 049 929.

Oppfinnelsen er illustrert ved følgende eksempler. I alle disse eksempler er celletettheten uttrykt som tørrvekt av gjær per liter kultur.

127540

Eksempel 1

40 liter av et vandig næringsmedium med den nedenfor angitte sammensetning ble innført i et fermenteringsapparat av rustfritt stål med en effektiv kapasitet på 60 liter.

For å holde temperaturen i apparatet konstant ved 30°C ble vann sirkulert i en kappe dannet av mellomrommet mellom to konsentriske sylindere, idet den minste var selve fermenteringsbeholderen. Det vandige næringsmedium hadde sammensetningen:

Diammoniumfosfat	2 g
Kaliumklorid	1.15 g
Magnesiumsulfat, 7H ₂ O	0.65 g
Sinksulfat	0.17 g
Mangansulfat, 1H ₂ O	0.045 g
Ferrosulfat, 7H ₂ O	0.068 g
Gjærekstrakt	0.025 g
Vannledningsvann	200 g

Destillert vann for å fylle opp til 1000 ml.

20 liter av et 24 timers podningsmateriale av *Candida lipolytica* på blandede C₉ - C₁₆ normale hydrokarboner ble deretter tilsatt, slik at celletettheten var ca. 1 g tørrstoff per liter.

1.03 liter tung gassolje, dvs. 15 g/l, ble deretter tilsatt, idet denne mengde var tilstrekkelig til å få en celletetthet på 2 g/l.

Temperaturen i kulturen ble holdt ved 30° ± 1°C, pH ved 4 og gjennomluftingen og omrøringen var slik at det ga 3 millimol O₂ per liter medium per minutt. 10 N ammoniakk ble tilført ved hjelp av en automatisk pH-regulator.

Når ammoniakkstrømmen nådde 20 ml ble tilsetningen av gassolje påbegynt under forutsetning av et utbytte fra gassolje på $\frac{(100 \times \text{dannet tørr gjær})}{(\text{tilført gassolje})} = 10$ vektprosent og en celledelingstid på 3 timer. Denne tilsetning ble utført hver time inntil 200 g/l, dvs. 13.8 liter, var blitt tilsatt.

Ved å gå ut fra en celletetthet på 2 g/l ble det etter 25 timer ved slutten av eksponensialvekstfasen oppnådd en tetthet på 15 g/l. Denne verdi forble konstant under den stasjonære fase fra 25 til 40 timer. I løpet av denne periode manglet gjærkarbonråmateriale, idet andre elementer var tilstede i overskudd. Denne periode artet seg som en utsultingsfase.

127540

Gjæren ble gjenvunnet etter 25 timer og etter 40 timer ved sentrifugering og vasking ved $+5^{\circ}\text{C}$. Den ble deretter tørket ved hjelp av lyofilisering og analysert. Det totale lipidinnhold (fraksjon oppløselig i heksan) var 18 % når gjæren ble gjenvunnet etter 25 timer, og 3 % når den ble gjenvunnet etter 40 timer.

Eksempel 2

Et lignende forsøk ble utført som beskrevet i eksempel 1 med unntagelse av at gjæren ble gjenvunnet fra kulturvæsken etter 25 timer og deretter plassert i 60 liter friskt mineralmedium uten hydrokarbon i samme gjæringskar. Blandingen ble deretter omrørt i 10 timer under de samme kulturbetingelser (temperatur 30°C , pH, gjennomlufting 3 millimol O_2 per liter/time). Celletettheten var av størrelsesorden på 15 g/l i begynnelsen, og forble konstant gjennom hele forsøket. Selv om gjæren på tørr basis inneholdt 20 vektprosent total mengde lipider i det øyeblikk den ble innført i det nye mediet, inneholdt det etter utsultingsbehandlingen ikke mer enn 8 vektprosent.

Eksempel 3

Et lignende forsøk som beskrevet i eksempel 1 og 2 ble utført ved bruk av gjæren fra kontinuerlig fermentering, men i dette tilfelle var det nødvendig å arbeide med vasket gjær i et friskt medium, fordi man i den kontinuerlige prosess ikke kan oppnå en avtappingsvæske som er helt fri for assimilerbart karbonsubstrat.

Dyrkningen ble foretatt i et 60 liters gjæringskar og stabilisert ved tilførsel av 0.1 l/time av totalt mineralmedium + gassolje per liter kultur i gjæringskaret.

Etter at driftsbetingelsene var fastsatt (spesielt temperaturen ved 30°C og pH-verdien på 4), ble gjæren fjernet fra en del av kulturen ved sentrifugering ved $+5^{\circ}\text{C}$. Etter vasking ble den ført inn i et 20 liters gjæringskar inneholdende 15 liter av det mineralmedium som er angitt i eksempel 1, for å gi en celletetthet på 20 g/liter.

pH-verdien ble automatisk stilt til 4, temperaturen til 30°C og luftstrømmen og omrøring ble stilt slik at det ble tilført 3 millimol oksygen per liter kultur per minutt. Behandlingen foregikk i 10 timer. Celletettheten forble 20 g/liter i hele forsøket. Gjæren ble analysert for å finne dens fettinnhold ved begynnelsen og slutten av prosessen. En merkbar nedgang i fettinnhold ble observert, fra 15 til 5 vektprosent på tørrstoffbasis.

127540

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte til fremstilling av et gjærprodukt hvor en gjær under veksttrinnet dyrkes i nærvær av en hydrokarbonblanding bestående helt eller delvis av rettkjededede hydrokarboner, et vandig næringsmedium og en gass inneholdende fritt oksygen, og deretter, om nødvendig, fraskilles hovedmengden av ikke forbrukt hydrokarbon hvorved det oppnåes en gjær som bare inneholder en liten mengde hydrokarbon som forurensning, k a r a k t e r i s e r t v e d at gjæren deretter i et rensetrinn dyrkes i et vandig næringsmedium og i nærvær av en gass inneholdende fritt oksygen uten tilførsel av hydrokarbonblanding, hvorved det hydrokarbon som forurenser mikroorganismen, og biprodukter som er dannet under dyrkingen, reduseres i mengde eller elimineres.

Anførte publikasjoner:

Fransk patent nr. 1297033, 1297619