



18

P.- 56.511

K 1283 SPA

23365

e12k

F.C. 13-11-75

423365

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de SHELL INTERNATIONALE RESEARCH MAATSCHAPPIJ
B.V.

entidad holandesa

establecida en Carel van Bylandtlaan 30, La Haya,
Holanda

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE MICRO-
ORGANISMOS" (Clase Internacional C12k)

Prioridad reivindicada: Gran Bretaña, 20 de Febrero
de 1973, Nº 8198/73

423365



P. - 56,511
K 1285 SPA

Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de microorganismos. Se conocen muchos microorganismos que pueden utilizar hidrocarburos o ciertos derivados oxigenados o de otro tipo de los mismos como su manantial de carbono y/o de energía. La biomasa seca obtenible mediante el cultivo de dichos microorganismos es frecuentemente rica en proteínas y ha sido considerada como un posible alimento o suplemento para alimentos para hombres y animales. A este respecto tienen interés particular microorganismos que son capaces de utilizar un compuesto orgánico que contiene un único átomo de carbono en su molécula, por ejemplo metano o metanol.

Un objeto del presente invento es crear un procedimiento mejorado para el cultivo de microorganismos que utilizan metanol.

Correspondientemente el invento crea un procedimiento para la producción de microorganismos en que un microorganismo que utiliza metanol es hecho crecer en condiciones aerobias en un medio de crecimiento líquido que comprende metanol, manantiales de nitrógeno asimilables y sales minerales esenciales, y en la presencia de uno o más microorganismos que no utilizan metanol que son capaces de metabolizar una sustancia producida por el microorganismo en crecimiento que utiliza

25
29-1-74.

423365



metanol.

El término "microorganismo" se utiliza aquí en un sentido amplio, para incluir no solamente bacterias sino también levaduras, hongos y actinomicetos.

5 Se ha encontrado que la presencia de ciertos microorganismos que no utilizan metanol en cultivos mixtos con microorganismos que utilizan metanol resulta dar lugar a un efecto sinérgico cuyo resultado es una mayor velocidad de crecimiento y un mayor rendimiento

10 de microorganismos que cuando el microorganismo que utiliza metanol es cultivado y hecho crecer por sí sólo. Se obtienen ciertas otras ventajas en procedimientos que utilizan dichos cultivos mixtos, incluyendo una resistencia acrecentada a la infección y una producción

15 reducida de espuma en comparación con procedimientos que utilizan un único microorganismo.

Los cultivos mixtos para utilizarse en el procedimiento del invento pueden obtenerse de una de dos maneras:

20 (a) Cultivos mixtos que comprenden un microorganismo que utiliza metanol en asociación con menores números de microorganismos que no utilizan metanol han sido aislados desde manantiales naturales. El aislamiento y la caracterización de dichos cultivos mixtos está ilustrada en los Ejemplos 1 y 2 que se dan más aba

25
29-1-74.

423365



jo. Un cultivo mixto particularmente preferido, designado por JMS 72 (caracterizado en el Ejemplo 2) ha sido aislado y se ha encontrado que consiste en un nuevo organismo que utiliza metanol NCIB nº 11.040 no descrito con anterioridad y cuatro microorganismos que no utilizan metanol, dos especies del género Pseudomonas (NCIB nº 11.019 y 11.022), una especie del género Acinetobacter (NCIB nº 11.020) y una especie del género Curtobacterium (NCIB nº 11.011).

10 Se apreciará que un nuevo microorganismo que utiliza metanol, tal como el arriba citado como un componente del cultivo mixto JMS 72, puede ser hecho crecer también en la ausencia de microorganismos que no utilizan metanol. Correspondientemente, procedimientos para la producción de cultivos puros de dichos nuevos microorganismos están incluidos dentro del alcance del invento.

15 (b) Pueden obtenerse también cultivos mixtos apropiados combinando una o más cepas conocidas de microorganismos que utilizan metanol con una o más cepas conocidas de microorganismos que no utilizan metanol. Claramente, el organismo que utiliza metanol deberá liberar una o más sustancias que sean capaces de apoyar el crecimiento de los microorganismos que no utilizan metanol.

25
29-1-74.

423365



5 El microorganismo que utiliza metanol pre-
ferido es una bacteria en forma de varilla, no formado-
ra de esporas, no móvil, gram-negativa y aerobia, por
ejemplo el nuevo microorganismo NCIB 11.040. Dicho or-
ganismo utiliza de modo preferente metanol u otros manan-
tiales de hidrocarburos C₁. Otros ejemplos de géneros de
bacterias y levaduras que proporcionan cepas apropiadas
que utilizan metanol son Pseudomonas, por ejemplo Pseudo-
monas extorquens, Hyphomicrobium, ciertas bacterias
10 Vibrio, Pichia, Candida, Torulopsis y Hansenula. Ejemplos
de géneros de bacterias que proporcionan cepas apropia-
das que no utilizan metanol son Pseudomonas, Arthrobacter,
Chromobacterium, Mycobacterium, Achromobacta, Acinetobac-
ter, Curtobacterium y/o miembros de las Enterobacteria-
15 ceas.

El medio de crecimiento líquido contiene
aproximadamente de 1 a 200 g/l de metanol y preferible-
mente de 20 a 100 g/l del mismo.

20 El medio comprende también un compuesto ni-
trogenado que puede ser amoníaco, una sal amónica tal co-
mo el sulfato o el cloruro, un nitrato, por ejemplo un
nitrato de metal alcalino, o urea. El compuesto está
presente apropiadamente en una concentración de 3 a 50
g/l.

25 Otros elementos que están presentes en el
29-1-74.

423365



medio son fósforo, azufre, magnesio y hierro. El manan-
tial de fósforo lo constituyen preferiblemente uno o más
fosfatos, por ejemplo K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4
o $(NH_4)_2HPO_4$, o ácido fosfórico, presente preferiblemen-
5 te en una concentración de 3 a 20 g/l. El manantial de
azufre puede ser ácido sulfúrico o un sulfato tal como
 $(NH_4)_2SO_4$ apropiadamente en una concentración desde 0,5
a 5,0 g/l. Los dos metales son proporcionados en forma
de una u otra de sus sales, por ejemplo $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en
10 una concentración de desde 0,2 a 2,0 g/l y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
en una concentración de desde 0,01 a 0,1 g/l.

El medio puede contener también cantida-
des muy pequeñas de otros elementos en la forma de sa-
les apropiadas, por ejemplo calcio, manganeso, zinc,
15 cobalto, molibdeno y boro. Ejemplos de medios apropiados
están dados en los Ejemplos 1 y 4 siguientes.

El procedimiento del invento se puede lle-
var a cabo de manera discontinua, semicontinua o con
flujo continuo. Cuando el procedimiento se ha de llevar
20 a cabo de modo continuo puede ser iniciado bien sea de
modo discontinuo o utilizando el más rápido método de
puesta en marcha que se describe en la solicitud de pa-
tente del Reino Unido número 37.173/72 también pendien-
te. Cuando se alcanza una velocidad constante y perma-
25 nente se efectúa un cultivo continuo cosechando el mi-

29-1-74.

423365



croorganismo desde el medio que es retirado continuamente desde el cultivo en crecimiento, al tiempo que se mantiene un volumen constante del cultivo por adición continua de medio de nueva aportación. Durante el cultivo continuo la concentración de metanol en el líquido sobrenadante del cultivo en crecimiento es mantenida en un nivel limitador del crecimiento, independientemente de la cantidad de metanol en el medio alimentado al cultivo, y esta concentración es mantenida preferiblemente a un bajo nivel que no excede de 0,01% en volumen/volumen.

Los microorganismos pueden ser hechos crecer en un recipiente de fermentación apropiadamente adaptado, por ejemplo un fermentador con deflectores y mecanismo de agitación o un fermentador de torre de rociado, que está provisto con refrigeración interna o con un circuito externo de refrigeración con recirculación. La aireación del cultivo se puede efectuar mediante aire, mediante oxígeno o mediante aire enriquecido con oxígeno.

La temperatura de cultivo es mantenida generalmente entre 30 y 50°C, y preferiblemente entre 38 y 45°C. El pH del cultivo es controlado a un valor de 6,0 a 8,0, preferiblemente de 6,4 a 7,4 mediante la adición apropiada de un álcali, por ejemplo NaOH, KOH,

29-1-74.



NH_4OH , y/o un ácido, por ejemplo H_2SO_4 , H_3PO_4 .

Las células de microorganismos pueden ser cosechadas desde el medio en crecimiento por una cualquiera de las técnicas normales comúnmente utilizadas, por ejemplo floculación, sedimentación y/o precipitación, seguida por centrifugación y/o filtración. Luego la biomasa es secada, por ejemplo mediante secado por atomización o por congelación y puede ser utilizada en esta forma como un alimento proteínico o un suplemento de alimento para hombres y animales.

El invento es ilustrado con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Aislamiento de cultivos mixtos

Se ilustran más abajo tres técnicas para el aislamiento de cultivos mixtos desde manantiales apropiados. El medio de crecimiento utilizado en cada método es designado como DCR_2 y tenía la siguiente composición:

	metanol	5 - 50 g/l
20	Na_2HPO_4	3,0 "
	KH_2PO_4	3,0 "
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,5 - 9,0 g/l
	citrato de Na	0,125 "
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 "
25	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,167 "

29-1-74.

423365



	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,66	mg/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,18	"
	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,16	"
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,15	"
5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,18	"
	H_3BO_3	0,10	"
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,30	"
	agua	hasta un litro	

El pH del medio fue ajustado a 6,8 por la
10 adición de un álcali apropiado tal como hidróxido de so-
dio.

(a) Método del matraz con agitación. Matra-
ces con agitación de 250 ml que contenían 100 ml de me-
dio DCR2, 0,1% en volumen/volumen de metanol y 5 g del
15 material de manantiales fueron incubados a 42°C sobre
una mesa de agitación a 200 rpm. Cuando se obtuvo una
turbiedad evidente debida al crecimiento de microorga-
nismos, una muestra de 5 ml del cultivo fue transferida
a un segundo matraz con agitación que contenía 100 ml de
20 medio DCR2 y 0,1% en volumen/volumen de metanol. Este
procedimiento se repitió hasta obtenerse un buen creci-
miento reproducible. Los cultivos así obtenidos fueron
utilizados como inóculos para operaciones de cultivo ul-
teriores. Utilizando este método se aisló un cultivo
25 designado por BM 42 desde el lodo al lado de una fuente

29-1-74.



423365

termal caliente natural en Burundi, Africa.

(b) Método Chemostat. Un fermentador a es-
cala de laboratorio con un volumen de trabajo de 2,4 li-
tros que contenía medio DCR2 a 42°C y pH 6,8 fue agita-
do a 300-1000 rpm y fue rociado con aire a una veloci-
dad de 2 litros por minuto. El fermentador fue inocula-
do con 100 g del material de manantiales y se añadió
metanol en una concentración de 0,5% en volumen/volumen.
Cuando se observaba turbiedad acrecentada del cultivo
se añadió metanol adicional (0,5% en volumen/volumen).
Con un aumento adicional en la turbiedad el fermenta-
dor fue alimentado de manera continua con medio DCR2
que contenía 1% en volumen/volumen de metanol con una
velocidad de dilución de 0,08h⁻¹. Cuando se alcanzaron
condiciones de estado permanente, tal como se indica
por un valor constante de la densidad óptica del culti-
vo, la velocidad de dilución fue aumentada gradualmente
a 0,2h⁻¹. Utilizando este método se aisló un cultivo de
signado por JMS 72 desde el fluido saliente de unas
aguas residuales en Sittingbourne, Inglaterra.

(c) Método de turbidostato. En este méto-
do, las condiciones en el fermentador son controladas
cuidadosamente de manera que sólo se favorece el creci-
miento de los microorganismos que crecen con mayor rapi-
dez, siendo eliminados por lavado otros microorganismos

29-1-74.

423365



que crecen más lentamente. Esto se logra vigilando de
manera continua la densidad óptica de cultivo en el fer-
mentador, utilizando un registrador de crecimiento (véa
se Norris y otros "An automatic growth recorder for
5 microbial cultures" (Un registrador automático de cre-
cimiento para cultivos microbianos) en "Automation,
mechanisation and data handling in microbiology" (Automa-
tización, mecanización y manipulación de datos en mi-
crobología) Editorial Brillie and Gilbert, Academic
10 Press, 1970, páginas 151-161). El registrador de creci-
miento es provisto con un interruptor automático para
la bomba para medio, que es conmutado cuando la densi-
dad óptica excede de un valor previamente determinado y
es desconmutado cuando la densidad óptica desciende por
15 debajo de este valor.

5 g del material de manantiales fueron in-
cubados de una manera similar a la descrita en (a) arri-
ba. Cuando se observó turbiedad debida a crecimiento
bacteriano el cultivo fue filtrado para eliminar partí-
20 culas gruesas y luego fue utilizado para inocular el
turbidostato que fue alimentado con medio DCR2 que con-
tenía 1% en volumen/volumen de metanol. La temperatura
fue mantenida a 42°C y el pH en 6,8.

Utilizando este método se aisló un culti-
25 vo designado por ST42 de vegetación en descomposición

29-1-74.



423365

de Sittingbourne, Kent. En el aislamiento de este cultivo se controló la densidad óptica en un valor correspondiente a un peso en seco de microorganismos de aproximadamente 3 g/l y el cultivo tenía un tiempo de duplicación de población de 1,6 horas tras tres días.

Ejemplo 2 - Separación y caracterización de un cultivo mixto típico (JMS 72)

(a) Muestras de 1 ml del cultivo JMS 72 producido por el método del Ejemplo 1 (b) fueron retiradas del fermentador, colocadas en pequeños frascos de vidrio y diluidas con medio DCR2 que no contenía metanol hasta 10^{-6} , 10^{-7} o 10^{-8} veces la concentración en el fermentador. Se retiraron de los frascos muestras de 0,1 ml y se extendieron sobre placas de agar de (a) medio DCR2 y (b) medio de Lab Lemco. Cada placa fue cubierta con una tapa sobre la cual, en el caso de las placas DCR2, se colocó una pequeña cantidad de metanol. Luego las placas fueron invertidas e incubadas a 42°C durante 48 horas. El examen de las placas al final de este período reveló que (a) un único microorganismo (designado por EN) crecía solamente sobre las placas DCR2, y (b) cuatro microorganismos diferentes (designados por MU, FG, YL, GR) crecían sobre las placas de Lab Lemco.

Utilizando un bucle de alambre de platino, colonias individuales de cada microorganismo fueron

29-1-74.

423365



transferidas a placas de reciente preparación que conte
nían el medio de crecimiento apropiado y se dejaron cree
cer para dar cultivos puros de cada especie.

(b) Los cinco microorganismos aislados de
5 JMS 72 fueron sometidos a una serie de ensayos normali-
zados (1-30 en la Tabla 1) con el fin de determinar a
cual de los diversos géneros de microorganismos pertenee
cen. Los ensayos utilizados han sido descritos anteriore
mente en trabajos patrón tales como

10 (a) "Manual for the Identification of
Medical Bacteria" (Manual para la Identificación de bace
terias médicas), S.T. Cowan y K. J. Steel, Cambridge
University Press (1966).

(b) "Bergey's Manual of Determinative
15 Bacteriology", (Manual de "Bergey" de Bacteriología
Determinativa), 7ª edición, Williams y Wilkins (1959).

(c) "A Guide to the Identification of the
20 Genera of Bacteria" (Una guía para la identificación de
los géneros de bacterias), V.B.D. Skerman, 2ª edición,
Williams y Wilkins (1967).

Para algunos de estos ensayos se dispone
de métodos alternativos y más abajo se dan detalles bree
ves adicionales para indicar el método de ensayo real-
mente utilizado en estos casos.

25 9. Ensayo de oxidasa - Kovacs, 1956.

29-1-74.

423365



13. Crecimiento sobre caldo de KCN - modifica-
do por Møller, 1954 b; Rogers y Taylor 1961.

18. Lisina-d Descarboxilasa }
19. Arginina-dihidrolasa } - Medios oxoides;
20. Ornitina-d Descarboxilasa } Møller 1955

5

21. Hidrólisis de gelatina - Kohn, 1953

22. Producción de Indol - Reactivo de Kovacs,
1928

23. Ensayo de Voges - Proskauer - Barritt, 1936

10

24. Producción de H₂S - agar triple de azúcar
y hierro

25. Producción de ureasa - Medios oxoides, me-
dio de Christensen, 1946

15

26. Utilización de citrato - crecimiento sobre
cultivos inclinados de citrato Simons, confirmado en cal-
do de Koser.

28. Reducción de nitrato - ensayo de mancha de
yoduro en almidón en cuanto a nitrito.

20

Los resultados de los ensayos están resu-
midos en la Tabla 1 en que un signo + indica una reacción
positiva para el ensayo y un signo - indica una reacción
negativa. Sobre la base de estos resultados cuatro de
los microorganismos fueron cultivados del siguiente mo-
do:

25

MU Pseudomonas sp (NCIB no. 11019)

29-1-74.

423365



FG Curtobacterium (NCIB no. 11021)
YL Pseudomonas sp (NCIB no. 11022)
GR Acinetobacter (NCIB no. 11020)

5 El microorganismo que utiliza metanol, EN
(NCIB Nº 11.040) no podría ser clasificado satisfactoria-
mente, tomando como base estas propiedades, en ninguno
de los géneros conocidos de microorganismos.

10 La reacción de los microorganismos a un
cierto número de antibióticos conocidos fue evaluada así
mismo y los resultados de estos ensayos están indicados
en la Tabla 2.



423365

TABLA 1

Ensayo	Micro-organismo					
	que no utiliza metanol			que utiliza metanol		
	MU	FG	YL	GR	EN	
1. mancha gram	-	-	+/- variable	-	-	-
2. forma	varilla	varilla	varilla	varilla y COCOS	varilla	varilla
3. esporas	-	-	-	-	-	-
4. pigmento	-	Gris-amarillo pálido, plano, sobre agar de almidón	amarillo	gris	-	-
5. difusión de pigmento	-	-	-	-	-	-
6. movilidad	+	+	+	-	-	-
7. crecimiento en aire	+	+	+	+	+	+
8. catalasa	+	+	+	+	-	-
9. oxidasa	+	-	+	+	-	-
10. glucosa (ácido)	muy ligeramente +	muy ligeramente +	muy ligeramente +	muy ligeramente +	muy ligeramente +	muy ligeramente +



423365

TABLA 1 (Continuación)

Ensayo	Micro-organismo						
	que no utiliza metanol				que utiliza metanol		
	MU	FG	YL	GR	EN		
11. Hugh y Leifson (ensayo O-F)	oxidati- vo	oxidati- vo	oxidati- vo	oxidati- vo	-		
12. crecimiento sobre agar de McConkey	+	+	+	+	-	(después de 7 días)	
13. crecimiento sobre caldo KCN	-	-	-	-	-		
14. crecimiento sobre agar nutritivo	+	+	+	+	-		
15. dependencia del crecimiento con la temperatura	(agar nutri- cio)	(agar nutri- cio)	(agar nutri- cio)	(agar nutri- cio)	(DOR2/metanol al 0,5%)		
429C	+	+	+	+	+		
379C	+	+	+	+	+		
59C	-	-	-	-	-		
16. crecimiento sobre metilamina	-	-	-	-	-		
17. hemólisis (agar de sangre)	-	+	-	-	-		
18. lisina - descarbo xilasa	-	-	-	-	-		

29.1.74.

TABLA 1 (Continuación)

Ensayo	Micro-organismo						que utiliza metanol
	que no utiliza metanol						
	MU	FG	YL	GR	EN		
19. arginina - dihidro- lasa	-	+	-	-	EN	-	
20. ornitina - descar- boxilasa	-	+	-	ligeramen- te +	-	-	
21. hidrólisis de gela- tina	ligeramen- te +	variable	+	-	-	-	
22. producción de indol	-	-	-	-	-	-	
23. Voges-Proskauer	-	-	-	-	ningún creci- miento	-	
24. producción de H ₂ S	-	decolora- do	+	decolora- do	ningún creci- miento	-	
25. producción de urea- sa	-	-	+	no ensa- yado	muy ligeramen- te +	-	
26. utilización de citra- to	+	-	-	-	-	-	
27. hidrólisis de almi- dón	-	-	-	-	ningún creci- miento	-	
28. reducción de nitra- to	+	+	+	+	ningún creci- miento	-	

423365



423365



TABLA 1 (Continuación)

Ensayo	Micro-organismo					que utiliza metanol
	que no utiliza metanol					
	MU	FG	YL	GR	EN	
29. crecimiento sobre glicerina (ácido)	+	+	+	muy ligeramente +	+	
30. crecimiento sobre xilosa (ácido)	-	-	-	-	-	

29-1-74.

423365



TABLA 2

Antibiótico	Micro-organismo				
	que no utiliza metanol		que utiliza metanol		
	MU	FG	YL	EN	
5	Cloramfenicol	S	S	S	S
	Eritromicina	S	S	S	S
	Sulfafurazol	R	S	S	S
	Novobiocina	R	S	S	S
10	Oleandomicina	R	S	S	R
	Penicilina G	R	S	S	R
	Estreptomina	S	S	S	S
	Tetraciclina	muy S	S	S	muy S
	Cefaloridina	R	S	S	R
15	Kanamicina	R	S	S	S
	Sulfametoxazol/ Trimetoprim	R	S	S	S
	Ampicilina	R	S	R	R
	Acido nalidixico	S	R	S	S
20	Lincomicina	R	S	S	R
	Furazolidona	S	R	S	S
	Nitrofurantoina	S	R	S	S
	Meticilina	R	S	S	R
	Neomicina	S	S	S	R
25	Oxitetraciclina	S	S	S	S

29-1-74.



423365

TABLA 2 (Continuación)

Antibiótico	Micro-organismo			
	que no utiliza metanol		que utiliza metanol	
	MU	FG	YL	EN
5 Acido fusidico	R	S	S	R
Cloxacilina	R	S	R	R
Metanosulfonato de colistina	R	muy S	muy S	S
10 Polimixina	R	S	S	S
Carbenicilina	muy S	S	S	R
Gentamicina	S	S	S	S

S = sensible R = resistente

15 Ejemplo 3. Experimentos que usan el microorganismo que utiliza metanol (EN) de JMS 72

20 (a) El aparato consistía en un tubo con forma de H dividido en dos porciones por una membrana de diálisis colocada en la sección horizontal de tubo. Cada porción del tubo estaba llena con 25 ml de medio DCR2 y 0,2% de metanol. En tres experimentos separados una porción del tubo fue inoculada con

25 (i) organismo EN, (ii) organismo EN y (iii) ningún organismo respectivamente, y la otra porción fue inoculada con

29-1-74.

423365



(i) ningún organismo, (ii) y (iii) una mezcla de los organismos que no utilizan metanol MU, FG, YL, GR.

5 En cada experimento el aparato fue incubado sobre una mesa de agitación a 42°C. Los resultados obtenidos para las densidades ópticas en cada experimento están dados en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

	Lado 1	Lado 2
10	(i) Organismo EN DO final = 1,7	Ningún organismo DO final = 0
	(ii) Organismo EN DO final = 2,05	Mezcla de organismos MU, FG, YL, GR DO final = 0,55
15	(iii) Ningún organismo DO final = 0	Mezcla de organismos MU, FG, YL, GR DO final = 0,06

20 Los resultados muestran con claridad que el máximo crecimiento de microorganismos se obtiene cuando EN está creciendo en contacto con la mezcla de organismos que no utilizan metanol MU, FG, YL, GR. Los resultados indican también que una sustancia producida por el organismo EN es capaz de difundirse a través de la membrana separadora y está siendo utilizada por los

25
29-1-74.

423365



organismos MU, FG, YL y GR.

5 (b) (i) El microorganismo EN que utiliza metanol, puro, fue hecho crecer en un matraz de agitación que contenía 500 ml de medio DCR2 y 0,1% en volumen/volumen de metanol marcado con C^{14} . El matraz fue incubado luego a 422C sobre un agitador rotatorio de radio orbital 2,5 cm a 200 rpm. Cualquier cantidad de dióxido de carbono producido durante el cultivo fue absorbida sobre gránulos de hidróxido de sodio en un tubo
10 de seguridad acoplado al matraz. Después de dos días la densidad óptica del cultivo permanecía constante (indicando el final del crecimiento) y no podría detectarse metanol en el líquido de cultivo. Luego el cultivo fue centrifugado a 10.000 rpm. y el líquido sobrenadante
15 fue filtrado de modo estéril.

(ii) 100 ml de este líquido sobrenadante fueron inoculados con 1,0 ml del cultivo JMS 72 y el cultivo fue hecho crecer en un matraz de agitación de una manera similar a la arriba descrita.

20 En cada una de las etapas (i) y (ii) arriba descritas se vigiló la radioactividad debida al C^{14}

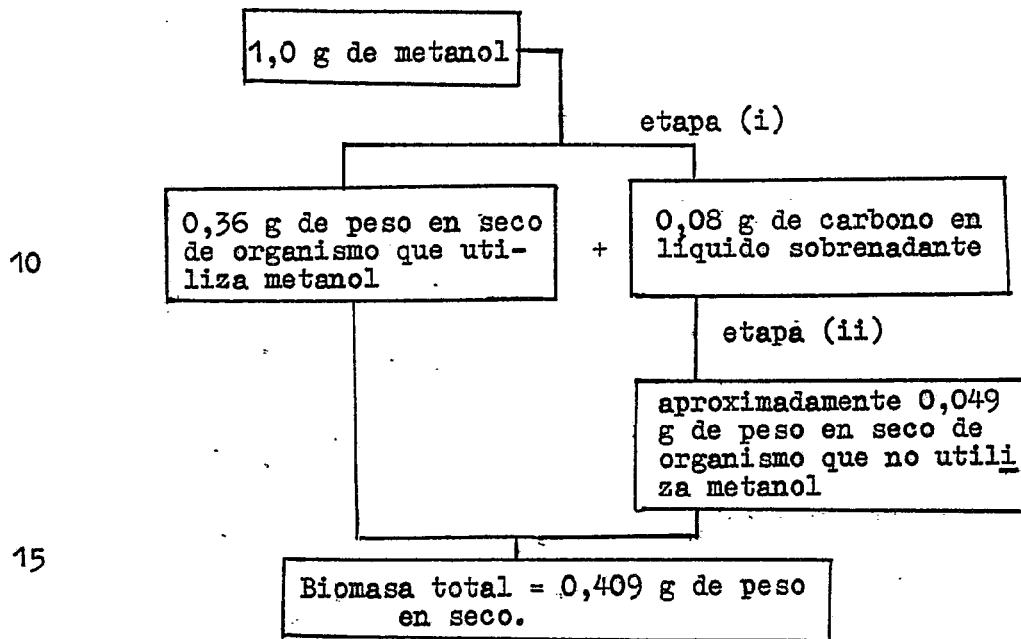
- A. inicialmente
- B. en las células producidas
- C. en el líquido sobrenadante al final
- 25 D. en el CO_2 producido

29-1-74.

423365



Dado que no estaba presente metanol en la etapa (ii), cualquier crecimiento de microorganismos de bía haber sido de los organismos que no utilizaban metanol en JMS 72. Los resultados están resumidos en el siguiente esquema de flujo u organigrama:



Es evidente a partir de estos resultados que el crecimiento de las bacterias que no utilizan metanol da como resultado un aumento de la producción total de biomasa. El experimento demuestra asimismo que la sustancia proporcionada para los microorganismos que no utilizan metanol por el organismo que utiliza metanol es un substrato de carbono para el crecimiento de

29-1-74.

423365

19 A



estos microorganismos.

Ejemplo 4. Cultivo continuo de JMS 72

5 Un recipiente fermentador de 7 litros que
tenía un volumen de trabajo de 4,2 litros fue cargado
con medio DCR2 que contenía 4,0 g/l de metanol y fue
inoculado con 100 ml de un cultivo de JMS 72 que previa-
mente había sido incubado a 42°C durante 1 día. El pH
del medio fue controlado a 6,8 y la temperatura lo fue
10 a 42°C. El cultivo fue agitado a 1.000 rpm y fue airea-
do a una velocidad de 1 l/h. La puesta en marcha de la
fermentación se llevó a cabo de modo discontinuo hasta
que la densidad óptica del cultivo hubo llegado a 1,5
(625 nm). Luego se comenzó el cultivo continuo con ve-
15 locidades de dilución dentro del margen de 0,05 a
0,66 h⁻¹. Se mantuvieron estados permanentes durante
al menos dos días con cada velocidad de dilución excep-
to con 0,66 h⁻¹ y el cultivo fue mantenido en total a
lo largo de 700 horas. Los coeficientes de rendimien-
20 to (g de biomasa seca/g de metanol) y el contenido de
proteínas de la biomasa obtenida con cada velocidad
de dilución están dados en la Tabla 4.

25

4.4.74
MCM

423365



Tabla 4

	Velocidad de dilución (h ⁻¹)	Coefficiente de rendimiento (g de biomasa seca/g de metanol)	Contenido de proteínas.
5	0,065	0,31	76,25
	0,162	0,40	79,37
	0,232	0,43	77,50
	0,319	0,49	79,37
	0,364	0,46	76,88
10	0,426	0,47	80,60
	0,545	0,45	78,75
	0,589	0,507	68,12
	0,638	0,537	66,88
15	0,66	eliminado por lavado	

El anterior experimento fue repetido usando el organismo que utiliza metanol EN sólo y usando EN juntamente con uno de los organismos que no utilizan metanol del tipo FG. Los resultados de estos experimentos están dados en la Tabla 5.

29-1-74.

423365



Tabla 5

Velocidad de dilución	Coeficiente de rendimiento (g de biomasa seca/g de metanol)	
	EN	EN + FG
5	0,06	-
	0,10	0,29
	0,12	0,29
	0,13	-
	0,16	0,30
10	0,19	eliminado por lavado
	0,24	-
		eliminado por lavado

De una comparación de los resultados de las Tablas 2 y 3 puede verse con claridad que la combinación de EN con todos los cuatro organismos que no utilizan metanol da un rendimiento de biomasa por gramo de metanol mayor que el de un cultivo puro de EN o de un cultivo que contiene EN y sólo uno de estos organismos que no utilizan metanol. La utilización de JMS-72 permite también que el procedimiento se lleve a cabo con mayores velocidades de dilución.

Los contenidos de aminoácidos del JMS 72 y del EN están dados en la Tabla 6.

29-1-74.

423365



Tabla 6

Amino ácido	Contenido %		
	JMS 72	EN	
5	Acido aspártico	9,41	9,67
	Treonina	4,29	4,60
	Serina	3,18	3,33
	Acido glutámico	9,84	10,13
	Prolina	3,17	2,73
10	Glicina	5,63	5,63
	Alanina	6,78	7,00
	Valina	5,72	6,21
	Cistina (1/2)	0,29	0,29
	Metionina	1,85	1,92
15	Isoleucina	4,46	5,01
	Leucina	7,71	7,95
	Tirosina	2,97	3,46
	Fenilalanina	3,93	3,96
	Amoníaco	2,21	2,17
20	Lisina	7,30	6,68
	Histidina	1,75	2,05
	Arginina	4,98	5,00

Estos datos muestran que la presencia de los microorganismos que no utilizan metanol en JMS 72

25

29-1-74.

423365

187



Tabla 7

	Velocidad de dilución (h ⁻¹)	Números de tipos de colonias				% de EN en el cultivo total
		FG	MU	YL	EN	
5	0,06	15	22	25	750	92,4
	0,10	5	17	21	740	94,5
	0,20	5	13	15	600	94,8
	0,30	4	8	12	580	96,0
	0,40	3	4	10	570	96,9
10	0,50	3	4	8	600	97,6
	0,55	2	3	1	600	99,2

Estos resultados muestran que en todo momento la mayor parte de la biomasa producida consiste en el microorganismo que utiliza metanol EN. El porcentaje de los organismos que no utilizan metanol varía dependiendo de la velocidad de dilución entre aproximadamente 0,8 y 7,6 % del cultivo total.

Ejemplo 6. Cultivo continuo de JMS 72 utilizando una puesta en marcha rápida

El medio utilizado en este experimento tenía la siguiente composición:

Na ₂ HPO ₄	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,00 g/l

25
29-1-74.

423365



	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,75 g/l
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,167 g/l
	$CaCl_2 \cdot H_2O$	5,3 mg/l
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4 mg/l
5	$CaSO_4 \cdot 5H_2O$	1,3 mg/l
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1,2 mg/l
	$CoCl_3 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l
	H_3BO_3	0,8 mg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2,4 mg/l
10	metanol	80 g/l
	agua	hasta un litro

Un fermentador de 7 litros fue cargado con 4,2 litros de este medio, que luego fue inoculado con un cultivo de JMS 72. El método de puesta en marcha descrito en la solicitud también pendiente número 37.173/72 fue utilizado para acumular la concentración de células en peso en seco a 16 g/l. Luego la concentración de metanol fue aumentada escalonadamente en incrementos de 1,0 g/l hasta que se obtuvo una concentración ponderal en seco de células superior a 25 g/l. Las condiciones durante el experimento fueron

temperatura 42°C;

pH 6,6 controlado con KOH;

agitación a 1500 rpm.;

aireación 5 l por minuto;

25

29-1-74.

423365



velocidad de dilución $0,07 - 0,3 \text{ h}^{-1}$.

Los resultados detallados de este experimento están resumidos en la Tabla 8 siguiente.

Tabla 8

5

Tiempo después de inoculación (horas)	Velocidad de dilución (h^{-1})	Peso en seco de células (g/l)
0-20	0,22 (puesta en marcha rápida)	2,0 - 16,0
20-190	0,12	18,0
190-240	0,17	20,0
240-265	0,33	21,5
265-340	0,04	22,0
340-570	0,08	27,4

10

15

Ejemplo 7 - Experimentos comparativos adicionales.

20

(a) Un cultivo discontinuo del organismo EN fue hecho crecer en 2,4 l de medio DCR2 que contenían 1,5% de metanol en un fermentador de 3 litros a escala de laboratorio a 42°C sin guardar precauciones asépticas después de la inoculación. Cuando la densidad de células hubo llegado a 3,0 g/l de peso en seco

25

29-1-74.

423365



se inició el cultivo continuo con una velocidad de dilución de $0,05 \text{ h}^{-1}$. En el espacio de dos días el cultivo resultó contaminado con un organismo portador de esporas y fue eliminado por lavado.

5 Cuando se repitió el mismo experimento utilizando el cultivo mixto JMS 72, el cultivo no resultó contaminado con organismos portadores de esporas durante 300 días de cultivo continuo. Estos experimentos muestran que el cultivo mixto tiene una mayor resistencia a la infección que un cultivo que utiliza metanol puro.

10

(b) Cultivos continuos del organismo EN fueron dispuestos en 2,4 l de medio DCR2 que contenía 1% de metanol a pH 6,8 y a 42°C . Se observó la formación de espuma durante el cultivo, y ésta resultó suficientemente grande para requerir la adición de agentes antiespumantes a base de silicona tres veces durante 6 días de cultivo continuo.

15

20 Cuando el mismo experimento se llevó a cabo utilizando JMS 72 no se requirió la adición de agentes antiespumantes en más de 100 días de cultivo continuo.

29-1-74.

423365



REIVINDICACIONES

5 1a.- Un procedimiento para la producción de microorganismos en que un microorganismo que utiliza metanol es hecho crecer en condiciones aerobias en un medio de crecimiento líquido que comprende metanol, man-
5 nantiales asimilables de nitrógeno y sales minerales esenciales, y en la presencia de uno o más microorganismos que no utilizan metanol que son capaces de metabolizar una sustancia producida por el microorganismo que utiliza metanol en crecimiento.

10 2a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1a, en que el microorganismo que utiliza metanol es una bacteria en forma de varilla, no formado
10 ra de esporas, no móvil, gram-negativa y aerobia.

15 3a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2a, en que el microorganismo que utiliza metanol es el organismo que tiene el número de entrada
15 NCIB nº 11.040.

20 4a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1a, en que el microorganismo que utiliza metanol es una cepa de Pseudomonas, Hyphomicrobium,
20 bacterias Vibrio, Pichia, Candida, Torulopsis ó Hansenu-
la.

24 5a.- Un procedimiento de acuerdo con una
24 cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en que
29-1-74.

423365

18



los microorganismos que no utilizan metanol son ce-
pas de Pseudomonas, Arthrobacter, Chromobacterium,
Mycobacterium, Achromobacta, Acinetobacter, Curtobac-
terium, y/o miembros de las Enterobacteriaceas.

5 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con una
cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en
que los microorganismos que no utilizan metanol son
dos especies del género Pseudomonas (NCIB nos. 11.019
y 11.022), una especie del género de Acinetobacter
10 (NCIB nº 11.020) y una especie del género Curtobacte-
rium (NCIB nº 11.021).

15 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con una
cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en
que el microorganismo que utiliza metanol y los micro-
organismos que no utilizan metanol son empleados en
un cultivo mixto designado por JMS 72 y caracteriza-
do en el Ejemplo 1 (b) y en el Ejemplo 2.

20 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con una
cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en
que la temperatura es mantenida en el margen de 38
a 45°C.

25 9ª.- Un procedimiento de acuerdo con una
cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en
que el pH es controlado en el margen de 6,4 a 7,4.

10ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION

11.2.74

