

433.184

20 DIC. 1974

P.- 59.162

K 1300 SPA

MEMORIA DESCRIPTIVA

Incl. Cl.:	C12K 1/00

para solicitar PATENTE DE INVENCION

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 UN MICRO-  
ORGANISMO"

(Clase Internacional C12k)

prioridad reivindicada: Gran Bretaña, el 7 de Enero de  
1974, nº 678/74.

Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de microorganismos. Son conocidos muchos microorganismos que pueden utilizar hidrocarburos o ciertos derivados oxigenados o de otro tipo de los mismos en calidad de su fuente de carbono y/o de energía. La biomasa secada que se obtiene por el cultivo de tales microorganismos, frecuentemente denominada proteína de una única célula, es rica en proteínas y puede emplearse como posible material o suplemento alimenticio para el hombre y los animales. A este respecto son de particular interés los microorganismos que son capaces de utilizar compuestos orgánicos gaseosos que contiene uno o más átomos de carbono en sus moléculas, por ejemplo metano.

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

En consecuencia el invento crea un procedimiento para la producción de microorganismos en los cuales un microorganismo que utiliza metano que es una cepa de Methylomonas se desarrolla bajo condiciones aerobias en un medio de desarrollo líquido que comprende fuentes asimilables de nitrógeno y sales minerales esenciales, en presencia de gas metano y en presencia de (a) uno o más microorganismos que utilizan metanol

29-11-74.

que es/son capaz/capaces de metabolizar el metanol producido por el desarrollo del microorganismo que utiliza metano; y (b) uno o más microorganismos no metiltróficos que es/son capaz/capaces de metabolizar sustancias orgánicas producidas por microorganismos que utilizan metano y/o metanol.

El término "microorganismo" se emplea en la presente memoria descriptiva en un sentido amplio incluyendo no solamente bacterias, sino también levaduras, hongos filamentosos, actinomicetos y protozoos.

La firma solicitante ha descubierto que en el cultivo mixto de microorganismos anteriormente mencionado existe un efecto sinérgico que da como resultado un régimen de desarrollo y un rendimiento de microorganismos superiores que cuando el microorganismo que utiliza metano se desarrolla solo o cuando los microorganismos que utilizan metano y metanol se desarrollan juntos. Otras ciertas ventajas se obtienen en los procedimientos que emplean tales cultivos mixtos incluyendo una mayor resistencia a la infección y una reducida producción de espuma comparadas con los procedimientos que solamente emplean una especie de microorganismo.

El metanol se sabe que es un metabolito intermediario de la utilización microbiana del metano y como tal puede encontrarse presente en el medio de cul-

25  
29-11-74.

tivo durante el desarrollo de bacterias que utilizan me  
tano. Por tanto, la presencia de microorganismos que uti  
lizan metanol además de las bacterias que utilizan meta  
no puede aumentar presumiblemente el rendimiento de mi-  
5 croorganismos desde un peso dado de metano dando una con  
versión más completa del metano en la biomasa, y realmen  
te esto ha sido confirmado por la firma solicitante. El  
rendimiento fue aumentado además en presencia de un ter-  
cer grupo de microorganismos (no metilotróficos). Esta  
10 observación puede explicarse como sigue: Los organismos  
no metilotróficos utilizan sustancias orgánicas produci-  
das durante el metabolismo del metano y el metanol aumen  
tando con ello el rendimiento de la biomasa, eliminando  
los metabolitos inhibidores, y producen moléculas que  
15 promueven el desarrollo. Los cultivos mixtos para empleo  
en el procedimiento del invento pueden obtenerse de uno  
de los dos modos siguientes:

(a) Los cultivos mixtos que comprenden un  
microorganismo que utiliza metano en asociación con cier  
20 to número de microorganismos que utilizan metanol y un  
número más pequeño de microorganismos no metilotróficos  
pueden aislarse de fuentes naturales. Ha sido aislado un  
cultivo mixto particularmente preferido denominado T3  
en los Ejemplos (y que tiene el número de registro NCIB  
25 11085) y se encontró que comprende un microorganismo que  
29-11-74.

utiliza metano caracterizado por membranas apiladas y denominado SM3 (NCIB 11084), un microorganismo que utiliza metanol de una nueva especie denominada OML (NCIB 11112) y cuatro microorganismos no metilotróficos denominados M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> en los Ejemplos. El organismo M<sub>1</sub> es una especie de Pseudomonas (NCIB 11062), el organismo M<sub>2</sub> es una especie de Mycobacterium (NCIB 11061), el organismo M<sub>3</sub> es una especie de Pseudomonas (NCIB 11063) y el organismo M<sub>4</sub> es una especie de Pseudomonas (NCIB 11065).

(b) Los cultivos mixtos adecuados también pueden obtenerse combinando una o más cepas de Methylo-  
monas con una o más cepas de microorganismos que utilizan metanol y una o más cepas de microorganismos no metilotróficos.

Ejemplos de microorganismos adecuados que utilizan metanol son cepas de Hyphomicrobium (por ejemplo NCIB Nº 11040), Pseudomonas extorquens y Pseudomonas methylo-  
trophica (por ejemplo NCIB Nº 10508-10515 y 10592 - 10596). Ejemplos de microorganismos no metilotróficos adecuados incluyen cepas de Pseudomonas (por ejemplo NCIB Nº 11019 y 11022), Acinetobacter (por ejemplo NCIB Nº 11020), Curtobacterium (por ejemplo NCIB Nº 11021), Mycobacteriaceae y Achromobacteriaceae.

El cultivo mixto T3 (NCIB 11085) antes men

cionado y las cepas SM3 (NCIB 11084), OML (NCIB .....),  
M<sub>1</sub> (NCIB 11062), M<sub>2</sub> (NCIB 11061), M<sub>3</sub> (NCIB 11063) y M<sub>4</sub>  
(NCIB 11065) son todos microorganismos nuevos y por con  
siguiente el invento también proporciona estos nuevos  
5 organismos así como un procedimiento para la producción  
de microorganismos en un medio de desarrollo líquido en  
el cual se emplean uno o más de estos microorganismos.

El medio de desarrollo líquido también com  
prende un compuesto que contiene nitrógeno que puede ser  
10 amoníaco, urea o una sal amónica tal como sulfato, cloru  
ro o un nitrato, por ejemplo un nitrato de metal alcali  
no. El compuesto se encuentra presente adecuadamente en  
una concentración de 3-50 g/l.

Otros elementos que pueden encontrarse pre  
15 sentes en el medio son fósforo, azufre, magnesio e hie  
rro. La fuente de fósforo preferiblemente está constitui  
da por uno o más fosfatos, por ejemplo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, o ácido fosfórico, preferiblemen  
te presente en una concentración de 3-20 g/l. La fuente  
20 de azufre puede ser ácido sulfúrico o un sulfato tal co  
mo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, adecuadamente en una concentración de  
0,5-5,0 g/l. Los dos metales se proporcionan como una u  
otra de sus sales, por ejemplo MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O en una concen  
tración de 0,2-2,0 g/l y FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O en una concentra  
25 ción de 0,01-0,1 g/l.

29-11-74.

El medio también puede contener cantidades trazas de otros elementos en forma de sales adecuadas, por ejemplo calcio, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y boro. Ejemplos de medios adecuados se dan en los Ejemplos.

5

El procedimiento del invento puede efectuarse de modo discontinuo y semicontinuo pero preferiblemente en un cultivo en flujo continuo. Para obtener el desarrollo los microorganismos se inoculan en el medio que se pone en contacto con una mezcla gaseosa que contiene metano y oxígeno. El metano puede suministrarse en forma de gas natural. Para el cultivo en flujo continuo los microorganismos pueden desarrollarse en cualquier recipiente de fermentación adecuadamente adaptado, por ejemplo un fermentador provisto de tabiques y agitación y un fermentador de tipo torre con rociado, que está provisto de refrigeración interna o un circuito de refrigeración con recirculación externa. El medio de nueva aportación se bombea continuamente al cultivo a regímenes equivalentes a 0,02 a 1,00 volúmenes de cultivo por hora y el cultivo se separa a un régimen tal que el volumen del cultivo permanezca constante. Una mezcla gaseosa que contiene metano y oxígeno y posiblemente dióxido de carbono u otros gases se pone en contacto con el medio preferiblemente por burbujeo continuo a través de un rociador en

10

15

20

25

29-11-74.

la base del recipiente. La fuente de oxígeno para el cultivo puede ser aire, oxígeno o aire enriquecido en oxígeno. El gas agotado se retira por la parte superior del recipiente. El gas agotado puede recircularse bien a través de un circuito externo o bien de modo interno por medio de un impulsor-inductor de gas. Los flujos de gas y la recirculación deben disponerse para dar el máximo desarrollo de los organismos y la máxima utilización del metano.

10 La temperatura del cultivo generalmente se mantiene entre 30 y 50°C y preferiblemente entre 38 y 45°C. El pH del cultivo se controla a un pH comprendido entre 6,0 y 8,0 y preferiblemente entre 6,4 y 7,4 por adición apropiada de un álcali, por ejemplo NaOH, KOH, 15 NH<sub>4</sub>OH, y/o un ácido, por ejemplo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Las células de microorganismos pueden recolectarse del medio de desarrollo por cualquiera de las técnicas típicas comúnmente utilizadas, por ejemplo 20 floculación, sedimentación, y/o precipitación, seguida por centrifugación y/o filtración. La biomasa se seca luego, por ejemplo por liofilización o por pulverización y puede emplearse de esta forma en calidad de material alimenticio proteínico o suplemento alimenticio para el hombre o los animales. El invento se ilustra 25 además en los ejemplos siguientes.

29-11-74.

### Ejemplo 1

#### Aislamiento de cultivos de bacterias que se desarrollan en metano

5 Un cultivo mixto de bacterias que se desarrolla en metano fue aislado a partir de una muestra de lodo tomada en una granja tropical de patos. Dos gramos de la muestra fueron colocados en un matraz de vibración de 250 ml que contenía 25 ml de medio 1SM (descrito en el Ejemplo 3) y se gasificó dos veces diariamente con una mezcla gaseosa consistente en 25% de metano y 75% de aire. El matraz fue incubado en un agitador rotatorio de radio orbital 2,5 cm a 200 revoluciones por minuto durante una semana. El cultivo en el cual se había desarrollado turbidez fue puesto en condiciones de subcultivo, utilizando 2 ml de inóculo, en matraces de vibración similares observando precauciones asépticas. 10 Esto se repitió varias veces y cuando se obtuvo un desarrollo muy reproducible, el cultivo del matraz de vibración fue utilizado para inocular un fermentador del tipo descrito en el Ejemplo 5. Las características del cultivo, denominado T3, se describen con detalle en el Ejemplo 2. 15 20

### Ejemplo 2

#### Características microbiológicas del cultivo T3

25  
29-11-74.

(1) El cultivo consiste en una bacteria

que utiliza metano obligada denominada SM3 (NCIB 11084) que se desarrolla en asociación con una bacteria que utiliza metanol y especies de bacterias no metilotróficas. El organismo que utiliza metano SM3 (NCIB 11084) tiene una morfología algo variable, apareciendo como bastoncillos cortos o bastoncillos cocci, y tiene una estructura de membrana interna dispuesta en pilas paralelas en las células. Este organismo se desarrolla sólo de modo débil solo sobre metano. Sobre la base de la descripción anterior el organismo parece ser una especie no descrita previamente de un tipo de Methylomonas (NCIB 11084).

(2) El organismo que utiliza metanol denominado OML (NCIB 11112) está caracterizado por su capacidad para desarrollar y formar colonias solamente sobre placas de agar que contienen metanol en calidad de única fuente carbonada. No se produce desarrollo en presencia de glucosa, lactosa, sacarosa, manita, inosita, citrato o agar nutriente. El organismo tiene aproximadamente una longitud de 2 micras y 1 micra de anchura, con un único flagelo polar. Las colonias sobre agar son lisas y grises con un margen total, apareciendo sobre placas de agar con metanol/sales minerales después de la incubación durante 2 días a 42°C. Sobre la base de la descripción anterior el organismo parece ser una especie no descrita previamente de un tipo Pseudomonas (NCIB 11112).

29-11-74.

(3) Fueron aislados otros tipos de organismos a partir de la mezcla, los cuales no podían desarrollarse ni sobre metano ni sobre metanol en calidad de única fuente carbonada. Estos fueron denominados M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub>. Estos fueron sometidos a ensayos típicos con el fin de determinar la clase general de microorganismos a la que pertenecían.

Los ensayos utilizados han sido descritos previamente en libros típicos tales como:

- 10 (a) "Manual for the Identification of Medical Bacteria",  
S.T. Cowan and K.J. Steel. Cambridge University  
Press (1966)
- (b) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology",  
7th Edition, Williams and Wilkins (1959)
- 15 (c) "A Guide to the Identification of the General of  
Bacteria", V.B.D. Skerman, 2nd Edition, Williams  
and Wilkins (1967)

Para algunos de estos ensayos son asequibles métodos alternativos de ensayos y a continuación se dan breves detalles adicionales para indicar el método de ensayo realmente utilizado en estos casos.

Ensayo de la oxidaza - Kovacs, 1956

Producción de indol - Reactivo de Kovacs, 1928

Ensayo de Voges-Proskauer - Barritt, 1936

25 Producción de ureasa-medios de Oxoid, medio de

29-11-74.

Christensen, 1946

Utilización de citrato - desarrollo sobre picos de flauta de citrato de Simons, confirmado en el caldo de Koser.

5 Los resultados de estos ensayos se muestran en las Tablas 1 y 2.

De los resultados de estos ensayos pueden sacarse las siguientes conclusiones en lo que respecta a la identidad de los organismos:

10 El organismo  $M_1$  es una especie de Pseudomonas (NCIB 11062). El organismo  $M_2$  es una especie de Mycobacterium (NCIB 11061). El organismo  $M_3$  es una especie de Pseudomonas (NCIB 11063). El organismo  $M_4$  es una especie de Pseudomonas (NCIB 11065).

29-11-74.

TABLA 1 IDENTIFICACION DE BACTERIAS QUE NO UTILIZAN METANO PRESENTES EN EL CULTIVO MIXTO T3-ENSAYOS DE LA PRIMERA ETAPA

ENSAYO	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>
CEPA GRAM	-	+	-	-
FORMA	bestón	bestón	bestón	bestón
ESPORAS FORMADAS	-	-	-	-
MOVIBLE	+ (por medio de flagelos polares)	-	+ (por medio de flagelos polares)	+ (por medio de flagelos polares)
PRODUCCION DE CATALASA	+	+	+	+
ACTIVIDAD DE OXIDASA	+	-	+	+
UTILIZACION DE GLUCOSA (ácido)	-	-	-	-
Ensayo O-F (Hugh & Leifson)	-	-	Oxidativo	Oxidativo
RESISTENTE A LOS ACIDOS	/	no resistente a los ácidos	/	/

TABLA 2 - IDENTIFICACION DE BACTERIAS QUE NO UTILIZAN METANO PRESENTES EN EL CULTIVO MIXTO T3 - ENSAYOS DE LA SEGUNDA ETAPA

ENSAYO	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>
ACTIVIDAD DE UREASA	-	+	-	+
UTILIZACION DE CITRATO	+	-	+	+
HIDROLISIS DE GELATINA	+	-	+	+
PRODUCCION DE INDOL	-	-	-	-
RM (rojo de metilo) & VP (Voges-Proskauer) REACCIONES	-	-	-	-
GLUCOSA (PRODUCCION DE ACIDO)	-	-	-	-
LACTOSA (ACIDO)	-	-	-	-
SACAROSA (ACIDO)	-	-	-	-
MANITA (ACIDO)	-	-	-	-
MALTOSA (ACIDO)	-	-	-	-
DESARROLLO SOBRE AGAR NUTRIENTE	+	+	+	+
ACTIVIDAD DE CATALASA	+	+	+	+
REDUCCION DE NITRATO	-	débil	débil	-

Ejemplo 3

Se desarrollaron cultivos en mezclas de las siguientes bacterias:

	SM3	(Solamente se desarrolla sobre metano)
5	OML	(Solamente se desarrolla sobre metanol)
	M <sub>1</sub>	(Una bacteria no metilotrónica)
	M <sub>2</sub>	"
	M <sub>3</sub>	"
	M <sub>4</sub>	"

10 Se preparó un medio de alimentación basado en el descrito por Sheehan & Johnson (denominado en lo que sigue medio ISM) que contenía los siguientes ingredientes:

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6 gramos/litro
15	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,16 "
	NaNO <sub>3</sub>	1,18 "
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,08 "
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,014 "
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,025 "
20	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>-6</sup> gramos/litro
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6,8 x 10 <sup>-7</sup> "
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6,0 x 10 <sup>-7</sup> "
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4,8 x 10 <sup>-7</sup> "

25 Los cultivos fueron desarrollados en recipientes estériles de vidrio de 500 ml de volumen a

29-11-74.

través de los cuales se burbujeó un suministro continuo de una mezcla de metano/aire.

El aparato consistía en una serie de reci  
pientes a través de los cuales se burbujeó una mezcla de  
5 metano (25%)/aire (75%) a través de un filtro de sinter  
sol. Las aberturas del aparato permitían la inoculación  
y la toma de muestras del cultivo.

Los matraces fueron inoculados con 1,5  
ml de un cultivo de nueva aportación (de 24 horas de  
10 antigüedad) de cada uno de los 4 organismos denominados  
 $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  y  $M_4$ . 4 ml de tanto las bacterias que utili-  
zan metano (SM3) como las que utilizan metanol (OML)  
fueron añadidos de cultivos de 2-3 días de antigüedad  
desarrollados en matraces de vibración en un medio ISM.

15 El medio en los recipientes era 400 ml de  
medio ISM descrito anteriormente y el desarrollo fue de  
terminado midiendo la densidad óptica (DO) a 625 nm de  
longitud de onda.

Los resultados se dan en la Tabla 3. Es-  
20 tos resultados muestran que un cultivo mixto es neces-  
ario para el mejor desarrollo sobre metano. La situación  
se mejora ligeramente por la presencia del utilizador  
de metanol pero para el mejor desarrollo se requieren  
24 todos los constituyentes.

29-11-74.

Tabla 3

Desarrollo obtenido sobre metano después de 3 días em-  
pleando diversas combinaciones de las bacterias presen-  
tes en el cultivo T3

5

Organismos presentes en el inóculo	Magnitud de desarrollo (unidades de densidad óptica después de 3 días).
SM3	0,14
SM3, OML	0,25
10 SM3, M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub>	0,27
SM3, OML, M <sub>1</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub>	0,59

Estos resultados son los valores medios de  
3 experimentos cada uno de ellos repetidos 2 ó 3 veces.

15

Ejemplo 4

20

Los experimentos siguientes se diseñaron  
para ver si los componentes del cultivo T3 podían reem-  
plazarse por otros microorganismos que tienen funciones  
similares. Los cultivos en recipientes de vidrio con bur-  
bujeo fueron realizados como en el Ejemplo 3, pero en  
algunos casos el utilizador del metanol del cultivo T3  
fue reemplazado por el organismo que utiliza metanol  
NCIB 11040. Similarmente los componentes no metilotrófi-  
cos del T3 fueron reemplazados por los organismos no me-  
tilotróficos NCIB N<sup>o</sup> 11019, 11020, 11021 y 11022. Los

25

29-11-74.

resultados de estos experimentos se representan en la Tabla 4.

Tabla 4

Aumento en la densidad óptica (a 625 nM) de diversos cultivos mixtos que se desarrollan sobre metano

5

(valores medios de 2 experimentos, cada uno de ellos repetidos 4 veces por cultivo)

CULTIVO					DO a 625 nM	
10	Utiliza dor de metano (SM3)	Utiliza dor de metanol (OML)	Utiliza dor de metanol (NCIB No 11040)	Organis mos no metilo- trófi- cos M1, M2, M3 y M4	Organis mos no metilo- trófi- cos (NCIB No 11019- 11022)	Después de 3 días
15	+	+	-	+	-	0,53
	+	-	+	+	-	0,56
	+	-	+	-	+	0,57

+ = presente en el cultivo - = Ausente en el cultivo.

La diferencia entre las cifras en las columnas verticales de la Tabla 6 no es significativa. Por consiguiente puede concluirse que los organismos OML pueden sustituirse por los organismos que utilizan metanol NCIB No 11040. Similarmente los componentes no metilotróficos son intercambiables.

24

29-11-74.

### Ejemplo 5

#### Fermentaciones que emplean el cultivo T3

El cultivo se desarrolló en un cultivo continuo sobre un medio mineral, metano y aire. Se empleó un fermentador Biotec de un volumen de trabajo de 2,5 litros. El metano y el aire se rociaron en el contenido de líquido a un caudal de 150 ml/min y 450 ml/min respectivamente. La temperatura del medio se controló a 42°C y el pH a 7,4 por adición automática de NaOH 2N. El medio fue agitado a una velocidad de 1000 revoluciones por minuto y la presión de trabajo del fermentador era sólo ligeramente superior a la presión atmosférica.

El medio líquido denominado SJ4 utilizado para cultivo continuo tenía la siguiente composición:

15	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,6 g/l
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,16 g/l
	$\text{NaNO}_3$	3,18 g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,107 g/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,009 g/l
20	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,06 g/l
	Solución de elementos trazas	1 ml/l
	Acido sulfúrico concentrado	0,33 ml/l
	Agua destilada hasta 1 litro	

La solución de elementos trazas utilizada para ajustar el medio tenía la composición siguiente:

29-11-74.

	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3 g/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,336 g/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,213 g/l
5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,015 g/l

Esta solución de material fue añadida al resto del medio a una concentración de 1 ml/litro como se ha mencionado anteriormente.

El fermentador fue cargado primeramente con 2  
10 litros de medio ISM (véase Ejemplo 1) se agitó, se aireó y se le suministró metano tal como se ha descrito anteriormente. Se inoculó con 100 ml de un cultivo T3 de un matraz agitado completamente desarrollado. Una vez que  
15 había tenido lugar el desarrollo en el fermentador, se alimentó medio SJ4 a un régimen de dilución de  $0,08 \text{ h}^{-1}$ . Este se aumentó en etapas de  $0,02 \text{ h}^{-1}$  a intervalos de 2 días hasta  $0,22 \text{ h}^{-1}$  sin lavar el cultivo. Se obtuvieron estados estacionarios en los cuales la concentración  
20 de biomasa era de 2,5 a  $6 \text{ gl}^{-1}$ . Esto en ningún modo representa la concentración de biomasa más elevada obtenida en cultivo continuo. El cultivo fue mantenido en cultivo continuo durante más de 3000 horas. Los organismos fueron recogidos y sometidos a análisis, cuyos resultados se muestran en los Ejemplos subsiguientes.

25 En cualquier estado estacionario para un régimen  
29-11-74.

men de dilución particular en cultivo continuo no cambió la proporción de la población total de bacterias representada por cualquiera de las especies bacterianas. También el cultivo era muy resistente a la infección por microorganismos extraños, de modo que no podía detectarse contaminación incluso cuando el cultivo fue infectado deliberadamente con organismos extraños.

#### Ejemplo 6

Un cultivo mixto de bacterias que utilizan metano fue desarrollado en un cultivo continuo en un fermentador de 300 litros bajo condiciones esencialmente equivalentes a las descritas para la fermentación en pequeña escala. Las células fueron cosechadas por centrifugación y secadas por pulverización. Se obtuvo un polvo exento de olor y color de fácil fluidez (SCP) consistente en células bacterianas secas. Tiene un contenido de proteínas de por ejemplo de e. 78% (calculado como  $N \times 6,25$ ). La calidad nutricional del polvo se ensayó en pruebas para alimentar ratas como sigue.

El SCP fue alimentado a ratas recién destetadas en pruebas de 10 días de modo que el SCP formaba la única fuente proteínica de la dieta. En cada prueba se incluyó una dieta de control que contenía caseína como única fuente de proteínas. Harina de arenques, una de las formas más ricas de suplementos alimenticios para

29-11-74.

animales, fue también alimentada a las ratas para comparación. El nivel de proteína bruta, (N x 6,25) en cada dieta era 10% pero los otros nutrientes fueron proporcionados en cantidades adecuadas para el desarrollo óptimo. Los resultados de la prueba de alimentación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Constituyente de la dieta	Eficacia de la conversión alimenticia	Relación de la eficacia proteínica
10 Caseína	0,243	(2,50)
SCP	0,256	2,59
Harina de arenques	0,233	2,2

De la Tabla 5, puede deducirse que el SCP producido a partir de un cultivo mixto de bacterias que se desarrollan sobre el metano es una forma satisfactoria de suministro proteínico. Realmente, es mejor que la harina de pescado en calidad de constituyente de la dieta para la alimentación animal.

Fue analizado el espectro de aminoácidos del SCP y los resultados se muestran en la Tabla 6. Estos resultados indican que el balance de aminoácidos es tal que el SCP es muy adecuado como alimento proteínico para animales.

29-11-74.

TABLA 6

<u>Contenido de aminoácidos del SCP</u>	
Aminoácido	% de proteína bruta (g/16 g N)
5	Acido aspártico 8,48
	Treonina 4,00
	Serina 3,30
	Acido glutámico 9,96
	Prolina 4,18
10	Glicina 4,63
	Alanina 6,16
	Valina 5,91
	Cisteina (1/2) 0,31
	Metionina 2,78
15	Isoleucina 4,50
	Leucina 7,02
	Tirosina 3,51
	Fenilalanina 4,37
	Amoníaco 2,09
20	Omitina 0,16
	Lisina 5,43
	Histidina 2,00
	Arginina 5,84
	% de N m/m 11,4
25	Proteína bruta (% en peso seco) 71,25

29-11-74.

## REIVINDICACIONES

5           1ª.- Un procedimiento para la producción de microor-  
ganismos en el cual un microorganismo que utiliza metano  
que es una cepa de Methylomonas se desarrolla bajo condi-  
ciones aerobias en un medio de desarrollo líquido que com-  
prende fuentes asimilables de nitrógeno y sales minerales  
esenciales, en presencia de metano gaseoso y en presencia  
de (a) uno o más microorganismos que utilizan metanol que  
es/son capaz/capaces de metabolizar el metanol producido  
por el desarrollo de los microorganismos que utilizan me-  
10           tano, y (b) uno o más microorganismos no metilotróficos  
que es/son capaz/capaces de metabolizar las sustancias  
orgánicas producidas por los microorganismos que utilizan  
metano y/o metanol.

15           2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindica-  
ción 1ª, en el que la cepa de Methylomonas que utiliza  
metano es el organismo que tiene el número de registro  
NCIB 11084.

20           3ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindica-  
ciones 1ª o 2ª, en el que el microorganismo que utiliza  
metanol es el organismo que tiene el número de registro  
NCIB 11112.

24           4ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindi-  
caciones 1ª o 2ª, en el que el microorganismo que utiliza  
metanol es una cepa de Hyphomicrobium, Pseudomonas extor-  
29-11-74.

21



quens o Pseudomonas methylo tropha.

5 5ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-4ª, en el que el microorganismo no metilotrófico es una especie del género Pseudomonas que tiene el número de registro NCIB 11062, 11063 ó 11065.

10 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-4ª, en el que el microorganismo no metilotrófico es una especie del género Mycobacterium que tiene el número de registro NCIB 11061.

15 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo que utiliza metano, el microorganismo que utiliza metanol y los microorganismos no metilotróficos se emplean en un cultivo mixto denominado T3 y que tiene el número de registro NCIB 11085.

8ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-7ª, en el que la temperatura se mantiene en el intervalo de 38-45°C.

20 9ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-8ª, en el que el pH se controla en el intervalo de 6,4-7,4.

10ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN MICROORGANISMO.

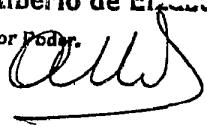
25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

21 MAR 1975

Esta Memoria consta de veintiseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 21 MAR. 1975  
P.A.

Alberto de Elguero  
For Poder.  


14-3-75  
jui