

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

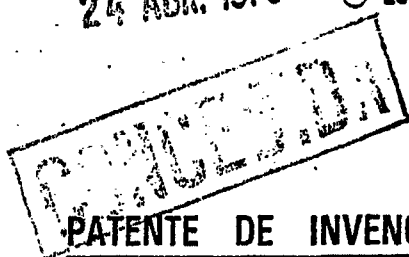


24 ABR. 1978

10 ES 11 21 22

NUMERO	45.7.442
FECHA DE PRESENTACION	1-4-77

10 A1



**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
13442/76	2 de abril de 1.976	Inglaterra.
51198/76	8 de diciembre de 1.976	Inglaterra.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12 K	

64 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE CELULAS.

71 SOLICITANTE (ES)
IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Imperial Chemical House, Millbank, Londres SW1, Inglaterra.

72 INVENTOR (ES)
FRANK PETER MASLEN, JOHN CLARK OUSBY, PETER JAMES SENIOR.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO

5. Esta invención se relaciona con un procedimiento para el cultivo de células y en particular se relaciona con un procedimiento para cultivar microorganismos, por ejemplo bacterias, levaduras y hongos. Sin embargo, el proceso no se limita al cultivo de microorganismos, pudiéndose aplicar, por ejemplo, al cultivo de tejidos.

10. El rendimiento en términos de biomasa producida a energía suministrada en nuestros procesos microbiológicos prácticos, es frecuentemente inferior al rendimiento máximo que como se sabe puede ser alcanzado, por lo que nosotros indentificamos como causa de lo anterior la naturaleza intermitente de la disponibilidad de energía hacia las células. En esta memoria, y cuando se hace referencia a una fuente de energía, se quiere dar a entender una fuente de energía que constituye un factor limitativo de la velocidad de crecimiento del cultivo relacionado. 15. De este modo, cuando la fuente de energía es la fuente de carbono, se está refiriendo a un crecimiento de cultivo con limitación de carbono.

20. Mediante el término naturaleza intermitente de disponibilidad de energía, se quiere dar a entender las variaciones en la concentración de la fuente de energía en el cultivo en crecimiento, que resultan de las desviaciones de un suministro establecido de fuentes de energía en el sustrato. Estos cambios de concentración en el cultivo se traducen en variaciones en la 25. velocidad específica de crecimiento o viceversa. La aparición de estos periodos de crecimiento específica prácticamente cero constituye el factor que afecta a la eficacia bioenergética global del organismo, más que los efectos aparentes de variabilidad de suministro de energía al cultivo total.

30. Nosotros aplicamos esto último mediante la provi-

sión de dispositivos mecánicos que pueden suministrar fuentes de energía por impulsos al cultivo microbiológico.

5. Cuando se suministra una fuente de energía a un cultivo por impulsos, la misma se suministra en cantidades discretas en determinados periodos de tiempo. Cada periodo de suministro viene seguido por un periodo durante el cual la energía que ha sido suministrada es disponible para utilizarse por el cultivo. Cuando se ha empleado toda la energía suministrada, viene entonces un periodo durante el cual no se suministra energía
10. o durante el cual no es disponible al cultivo. En esta memoria, por el término tiempo de impulso se quiere dar a entender el periodo de tiempo durante el cual se suministra energía al cultivo más el siguiente periodo durante el cual la energía que ha sido suministrada es disponible para ser utilizada por el cultivo.
15. Por el término tiempo de ciclo se quiere dar a entender el tiempo de impulso más el siguiente intervalo de tiempo durante el cual no es disponible ninguna energía exógena al cultivo, es decir el periodo total entre el inicio de un periodo de suministro de energía y el inicio del siguiente periodo de dicha naturaleza,
20. incluyendo necesariamente el citado periodo total un periodo en donde no es disponible energía exógena al cultivo.

- Se han llevado a cabo experimentos en los cuales se hace disponible una fuente de energía, tal como una fuente de carbono, en un cultivo de crecimiento de microorganismos en
25. impulsos de frecuencia tanto regular como irregular. Por impulsos de frecuencia regular se quiere dar a entender impulsos que comprenden cantidades iguales de fuente de energía, por ejemplo fuente de carbono, adicionados en periodos de igual tiempo y separados por otros periodos de tiempo iguales. Por impulsos
30. de frecuencia irregular se quiere dar a entender periodos de fuer-

te de energía disponible de un modo distinto al definido anteriormente como regular, por ejemplo periodos cuya frecuencia varia al azar y también periodos de frecuencia distinta, siguiendo las frecuencias distintas un modelo o diseño repetitivo. A partir de los resultados de estos experimentos, se ha construido el gráfico mostrado en la figura 1 de los dibujos adjuntos. En el gráfico, la ordenada representa la relación de eficacia de biomasa (que varia de 0 a 1) para el cultivo, y que consiste en la relación de la eficacia de ... conversión de energía observada de un sistema biológico (como masa delante se define), obtenida en un ambiente sometido a una disponibilidad intermitente de energía, a la eficacia de conversión de energía de un sistema similar sometido a una disponibilidad continua de fuente de energía. En el gráfico, las abscisas, que se encuentran a escala logarítmica, representa el tiempo de ciclo.

Las abscisas constituyen también el tiempo de ciclo en media aritmética cuando los ciclos son irregulares. Cuando dichos ciclos irregulares no están ampliamente distribuidos alrededor del... promedio, la relación de eficacia medida está prácticamente de acuerdo con el gráfico mostrado en la figura 1. Sin embargo, cuando existe una amplia distribución de los ciclos alrededor del promedio, la relación de eficacia medida no está de acuerdo con este gráfico pero está de acuerdo con un computo del factor extraído mediante una consideración del promedio de peso de las relaciones de eficacia pertenecientes a ciclos individuales. El gráfico muestra las siguientes tres regiones particularmente:

Una primera región en la cual el tiempo de ciclo es bajo, es decir la velocidad de impulso (ciclos/unidad de tiempo) es elevada, siendo la relación de conversión de ener-

gia a eficacia de biomasa prácticamente unitaria y constante. De este modo, no se observa ningún efecto superficial sobre la eficacia energética.

5. Una segunda región en la cual el tiempo de ciclo es superior que en la primera región, es decir la velocidad de impulso es inferior y la relación de energía a eficacia de biomasa disminuye en primer lugar hasta un mínimo y a continuación aumenta, con el tiempo de ciclo, hasta alcanzar un valor superior constante, es decir forma una depresión en el gráfico.

10. Una tercera región en la cual el tiempo de ciclo es superior que en la segunda región, es decir la velocidad de impulso es inferior y la relación de eficacia es prácticamente constante. La relación de eficacia en esta región puede ser igual o inferior a su valor en la primera región. Esta tercera región termina cuando la velocidad de impulso llega a ser tan baja que la eficacia global del cultivo desciende a medida que los microorganismos presentes en el cultivo mueren en cantidades apreciables.

20. El gráfico descrito anteriormente se relaciona con aquel caso en donde el tiempo consumido por el crecimiento de cultivo a una elevada velocidad durante un ciclo, en respuesta a la disponibilidad de fuente de energía, es prácticamente inferior al tiempo de ciclo total. Con fines prácticos, la fracción del tiempo agotado en el crecimiento puede representarse, por aproximación, por la relación de la velocidad de crecimiento específica global impuesta ( $\mu$ ) a la velocidad de crecimiento específico máximo ( $\mu_{max}$ ) ( $\mu_m$ ) alcanzable mediante aquel cultivo cuando no está limitado por la disponibilidad de fuentes de carbono y energía. Se ha descubierto que a medida que la velocidad de crecimiento específica global impuesta alcanza  $\mu_m$  o a

30.

- medida que  $\mu_m$  se reduce de modo que se aproxime a  $\mu$ , entonces la influencia de la relación de eficacia sobre la eficacia energética de los cultivos aumenta para cualquier velocidad de impulso constante. Podrá apreciarse que los cambios en la velocidad específica de crecimiento del cultivo con disponibilidad continua pero con limitación de fuente de energía, puede causar cambios en la eficacia energética de un cultivo. La relación de eficacia previamente descrita se relaciona exclusivamente con los efectos adicionales causados por una fuente de energía disponible intermitentemente. Por el contrario, la disminución en la relación de  $\mu$  a  $\mu_m$  en un cultivo cuando la fuente de energía es disponible de modo intermitente, proporciona una eficacia energética disminuida para cualquier velocidad de impulso constante, cuando se compara con el correspondiente cultivo en el cual la fuente de energía es disponible de forma continua. Estos resultados se muestran en un segundo gráfico (figura 2) que tiene las mismas coordenadas de la figura 1 y están representadas por una serie de líneas para diferentes valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que indican el efecto de cambiar la proporción del tiempo agotado en el crecimiento rápido para cualquier ciclo.
- Un tercer gráfico, figura 3, muestra el efecto que puede obtenerse cuando los ciclos de disponibilidad de energía son estrictamente regulares. Se observa una reducción significativa en el efecto causado por la disponibilidad intermitente de energía. En esta memoria, la eficacia de conversión de energía ha de entenderse como la relación de fuente de energía que se conserva para formar biomasa dividido por la fuente de energía total utilizada; por ejemplo, cuando la única fuente de energía es un compuesto obteniendo carbón, dicha relación es la de la masa de carbono que se incorpora en la biomasa produ-

cida dividido por la masa total de carbono utilizado.

- Las variaciones o impulsos en la energía suministrada al cultivo, pueden resultar en los ciclos citados de disponibilidad de energía y no disponibilidad de energía al cultivo cuando los impulsos del suministro son suficientes para permitir que el organismo agote las reservas de fuente de energía en el medio de cultivo. Los impulsos de suministro de energía al cultivo, es decir la aparición de intervalos de tiempo entre sucesivos suministros al cultivo, puede suceder de dos formas diferentes o mediante cualquier combinación de estas dos formas diferentes. Según la primera forma, la energía se puede suministrar a un cultivo, por ejemplo en un fermentador de tanque, en impulsos separados por intervalos de tiempo, los cuales pueden ser controlados. Alternativamente, en la segunda forma, pueden existir intervalos espaciados entre los sucesivos puntos del suministro de energía a un cultivo que fluye a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos, suministrándose continuamente la fuente de energía en los puntos de suministro. Estas dos formas pueden ser combinadas suministrando la energía en impulsos separados por intervalos de tiempo en los puntos de suministro espaciados de la segunda forma. En la segunda forma, el efecto consiste en causar que células individuales del cultivo a medida que las mismas fluyen a lo largo de la trayectoria definida, se expongan a cambios de concentración que son los equivalentes de una fuente impulsada de energía.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

En la segunda forma, la distancia entre puntos de suministro de energía sucesivos y la velocidad de flujo del cultivo entre los puntos, determinan el equivalente del tiempo de ciclo en la primera forma. Este tiempo de ciclo equivalente se denominará a continuación tiempo de ciclo. La segunda forma se

30.

puede utilizar en los fermentadores de las patentes británicas n<sup>os</sup>. 1.353.008, 1.417.486 y 1.417.487 o en las solicitudes de patentes británicas n<sup>os</sup>. 35754/74 y 21288/75, relacionandose la última memoria con un fermentador que tiene una pluralidad de puntos de adición de nutriente.

5.

De acuerdo con una primera modalidad de un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el cultivo de células, en donde un cultivo de células se hace fluir a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos y se suministra una fuente de energía al cultivo en uno o más

10.

puntos, causando con ello que las células individuales del cultivo, a medida que fluyen a lo largo de la trayectoria, se expongan a cambios de concentración que o bien son eficazmente negligibles o bien son equivalentes a una fuente impulsada de

15.

energía, de modo que el tiempo de ciclo (como anteriormente se ha definido) es eficazmente cero o desciende dentro de la citada primera región de un gráfico de tiempo de ciclo contra relación de eficacia de biomasa bajo las condiciones ambientales aplicables al cultivo o descienden en la parte de la segunda región

20.

del gráfico que sigue inmediatamente a la primera región, siendo tal que la relación de eficacia de energía se encuentra dentro del 15% del valor de la primera región.

De acuerdo con una segunda modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para cultivar células en donde un cultivo de células se hace fluir a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos y se suministra una fuente de energía al cultivo en uno o más puntos, causando con ello que las células individuales del cultivo, a medida que fluyen a lo largo de la trayectoria, se expongan a cambios de concentración equivalentes a una fuente impulsada de energía

25.

30.

que es tal que el tiempo de ciclo (como anteriormente se ha definido) desciende dentro de dicha primera región de un gráfico del tiempo de ciclo contra la relación de eficacia de biomasa, bajo las condiciones ambientales aplicables al cultivo, o desciende en la parte de la segunda región del gráfico que sigue inmediatamente a la primera región, siendo tal que la relación de eficacia de energía se encuentra dentro del 15% del valor para la primera región.

De acuerdo con una tercera modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para cultivar células en donde se hace fluir un cultivo de células a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos y se suministra una fuente de energía al cultivo en uno o más puntos, causando con ello que las células individuales del cultivo, a medida que fluyen a lo largo de la trayectoria, se expongan a cambios de concentración que o bien son efectivamente negligibles o bien son equivalentes a una fuente impulsada de energía de modo que el tiempo de ciclo (como anteriormente se ha definido) o bien es eficazmente cero o bien, para un valor determinado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , no es superior al ofrecido en la siguiente tabla; estando los tiempos de ciclo máximos, para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

$\frac{\mu}{\mu_m}$	tiempos de ciclo (segundos)
superior a 0,5	30
0,2	6
0,1	4
0,05	3
inferior a 0,02	2,5

Preferiblemente, en el primer aspecto, el tiempo de ciclo a un valor determinado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  no es superior al tabulado a

continuación, estando los tiempos de ciclo máximo, para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

	$\frac{\mu}{\mu_m}$	tiempos de ciclo (segundos)
5.	superior a 0,5	15
	0,2	5
	0,1	3,5
	0,05	2,5
	inferior a 0,02	2

10. El primer aspecto de la invención es adecuado para procedimientos en los cuales se requiere una elevada eficacia de conversión de carbono a células, por ejemplo, en los procesos para la producción de proteínas de célula única mediante cultivo de microorganismos sobre una fuente de carbono adecuada, por

15. ejemplo metanol. Dicho proceso se describe en la patente británica nº 1.370.892. El primer aspecto se efectúa adecuadamente en un fermentador como el descrito en las patentes británicas nºs. 1.353.008, 1.417.486 ó 1.417.487 y en las solicitudes británicas copendientes nºs: 35754/74 y 21288/75 que se refieren a

20. un fermentador que tiene una pluralidad de puntos de adición de nutriente.

25. En la realización de los procedimientos en los cuales se requiere una elevada eficacia de conversión de carbono a células en un aparato en el cual un cultivo fluye a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos, es preferible suministrar la fuente de carbono de un modo continuamente eficaz al cultivo para proporcionar una distribución homogénea instantánea de la fuente de carbono. Por razones prácticas bien conocidas en la técnica, esta situación no se puede conseguir

30. bajo ciertas circunstancias, por ejemplo cuando el sustrato es

- un fluido altamente soluble y/o cuando el organismo tiene una elevada afinidad para la fuente de energía. En la práctica del primer aspecto de la invención, es preferible suministrar la energía, por ejemplo la fuente de carbono, al cultivo, en un tiempo de ciclo tan corto como sea posible, teniendo en cuenta los límites existentes en cualquier proceso particular. Preferiblemente, debe proporcionarse una pluralidad de puntos de suministro de fuente de energía. Las distancias entre puntos de suministros sucesivos alrededor de la trayectoria, necesarios para conseguir un tiempo de ciclo adecuado, dependerán de la velocidad del flujo del cultivo a lo largo de la trayectoria.
- 5.
- 10.

- Se pueden resolver a veces las dificultades existentes en el suministro de una fuente de energía de un modo continuamente eficaz a un cultivo, utilizando un sustrato escasamente soluble, tal como un alcano, alcohol de cadena larga o un hidrocarburo suministrado como un gas o vapor mediante atrapado en un vehículo o mediante modificación de la afinidad del organismo para el sustrato.
- 15.

- Los tiempos de ciclo anotados anteriormente resultan muy adecuados para procedimientos de obtención de proteínas de célula única a partir de metanol, usando preferiblemente cepas de las especies Methylophilus methylotrophus (anteriormente conocida como Pseudomonas methylotropha), cuyas características se describen en la patente británica nº 1.370.892. Como cepas muy adecuadas de esta especie pueden citarse las cepas NCIB Nos. 10508 a 10515 y 10592 a 10596 (equivalentes a NRRL Nos. B 5352-64 y FERM 1215-27). Preferiblemente, la velocidad del cultivo a lo largo de la trayectoria se controla y/o se controla también la velocidad de adición de la fuente de energía, por ejemplo fuente de carbono, en los puntos de suministro.
- 20.
- 25.
- 30.

5. De acuerdo con una primera modalidad de un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento biológico de un líquido que transporta material biológicamente degradable en solución y/o suspensión, que comprende una etapa en donde el líquido se suministra continuamente y/o por impulsos a uno o más puntos de un recipiente de tratamiento que contiene un cultivo de microorganismos, exponiendo con ello los microorganismos individuales del cultivo a una fuente impulsada de material biológicamente degradable o a cambios de concentración equivalentes a dicha fuente impulsada, la cual es tal que el tiempo de ciclo (como anteriormente se ha definido) cae dentro de la segunda región de un gráfico de tiempo de ciclo contra eficacia de biomasa bajo las condiciones ambientales aplicables al cultivo.

10. 15. Según una segunda modalidad del segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento biológico de un líquido que transporta material biológicamente degradable en solución y/o suspensión, que comprende una etapa en la cual el líquido se suministra continuamente y/o por impulsos a un recipiente de tratamiento que contiene un cultivo de microorganismos, en uno o más puntos, exponiendo con ello a los microorganismos individuales del cultivo, a una fuente impulsada de material biológicamente degradable o a cambios de concentración equivalentes a dicha fuente impulsada, la cual es tal que el tiempo de ciclo (como anteriormente se ha definido) para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  se encuentra dentro de la gama tabulada a continuación para dicho valor de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , estando las gamas de los valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

20. 25. 30.

	$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
5.	superior a 0,2	8 a 60
	0,1	4,5 a 120
	0,05	3,5 a 240
	0,02	2,5 a 600
	inferior a 0,01	2 a 1200

10. Preferiblemente, en el segundo aspecto, el tiempo de ciclo para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  se encuentra dentro de la gama tabulada a continuación para dicho valor de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , estando las gamas para los valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

	$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
15.	superior a 0,1	8 a 40
	0,05	5 a 80
	0,02	3,5 a 200
	0,01	3 a 400
	inferior a 0,005	2,5 a 900

20. El segundo aspecto de la invención resulta más adecuado como una etapa de cualquier procedimiento para el tratamiento biológico de aguas residuales. Se puede utilizar en un proceso aerobico productor de bióxido de carbono. Como un ejemplo de este tipo de procedimiento, se puede mencionar el proceso de las solicitudes británicas copendientes n<sup>os</sup>. 23328/73 y 53921/73. En el tratamiento de aguas residuales, es conveniente que la producción de lodos se reduzca al mínimo y que igualmente sea baja la eficacia de conversión de carbono de los microorganismos implicados en el tratamiento biológico. Por consiguiente, es preferible que la fuente de energía, como en este caso suministros de agua residual conteniendo material biológica-

25.

30.

mente degradable, se suministre en la forma anteriormente descrita. Sin embargo, podrá observarse, a partir del gráfico de la figura 3, que el empleo de impulsos irregulares podría ser más ventajoso que el empleo de impulsos regulares en esta aplicación.

5.

De acuerdo con una primera modalidad de un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la fermentación de un cultivo de células para producir un disolvente orgánico y/o moléculas orgánicas simples, en donde se suministra una fuente de energía continuamente y/o por impulsos al cultivo en uno o más puntos, exponiendo con ello las células individuales del cultivo a una fuente impulsada de energía o a cambios de concentración equivalentes a una fuente impulsada de energía, que es tal que el tiempo de ciclo ( como anteriormente se ha definido) cae dentro de la segunda región de un gráfico de tiempo de ciclo contra la relación de eficacia de biomasa bajo las condiciones ambientales aplicables al cultivo.

10.

15.

20.

25.

De acuerdo con una segunda modalidad del tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir un disolvente orgánico y/o moléculas orgánicas simples mediante cultivo de células, en donde una fuente de energía se suministra continuamente y/o por impulsos al cultivo, en uno o más puntos, exponiendo con ello a las células individuales del cultivo a una fuente impulsada de energía o a cambios de concentración equivalentes a una fuente impulsada de energía que es tal que el ciclo de tiempo, para un valor dado de  $\mu$ , se encuentra dentro de la gama tabulada a continuación para el valor de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , estando las gamas para los valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

30.

$\frac{\mu}{\mu_m}$	tiempos de ciclo (segundos)
superior a 0,2	8 a 60
0,1	4,5 a 120
0,05	3,5 a 240
0,02	2,5 a 600
inferior a 0,01	2 a 1200

5. Preferiblemente, en el tercer aspecto, el tiempo de ciclo para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  se encuentra dentro de la gama tabulada a continuación para dicho valor  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , estando las gamas para los valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
superior a 0,1	8 a 40
0,05	5 a 80
0,02	3,5 a 200
0,01	3 a 400
inferior a 0,005	2,5 a 900

15. Ejemplos de fermentaciones con disolvente en donde puede utilizarse convenientemente el tercer aspecto, incluyen las fermentaciones para producir etanol, otros alcoholes, ácidos orgánicos, cetonas, dioles y aldehídos. La fuente de energía es normalmente la fuente carbonada.

20. Los aspectos segundo y tercero de la invención son similares ya que en los procedimientos que los utilizan es conveniente que se mantenga en un bajo valor la eficacia de la conversión de carbono a células. Por consiguiente, los suministros de material biológicamente degradable en el segundo aspecto o de energía en el tercer aspecto, deberán impulsarse de tal modo que los procedimientos operen en o cerca de los valores mí-

30.

nimos de la relación de eficacia de energía. Con preferencia, el material biológicamente degradable o energía, se suministra en impulsos irregulares con el fin de maximizar el efecto deseado.

5.

Con preferencia, en los aspectos segundo y tercero, el tiempo de ciclo es tal que cae en una parte de la segunda región del gráfico en donde la relación de eficacia es inferior al 85% de los valores en las regiones primera y tercera respectivamente.

10.

De acuerdo con una primera modalidad de un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para cultivar células en donde una fuente de energía se suministra continuamente y/o por impulsos al cultivo, en uno o más puntos, haciendo con ello que las células individuales del cultivo se expongan a una fuente impulsada de energía o a cambios de concentración equivalentes a una fuente impulsada de energía

15.

que es tal que el tiempo de ciclo (como anteriormente se ha definido) cae dentro de la tercera región de un gráfico del tiempo de ciclo contra la relación de eficacia de biomasa bajo las condiciones ambientales aplicables al cultivo o cae en la parte de la segunda región del gráfico inmediatamente precedente a la tercera región, siendo tal que la relación de eficacia se encuentra dentro del 15% del valor para la tercera región.

20.

25.

Según una segunda modalidad del cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para cultivar células en donde se suministra una fuente de energía, continuamente y/o por impulsos al cultivo en uno o más puntos, causando con ello el que las células individuales del cultivo se expongan a una fuente impulsada de energía o a cambios de concentración equivalentes a una fuente impulsada de energía, que es tal que el

30.

5. tiempo de ciclo (como anteriormente se define) para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , se encuentra dentro de una gama entre el mínimo tabulado a continuación y el máximo en el cual la eficacia global del cultivo disminuye y los microorganismos presentes en el cultivo mueren en números apreciables, estando el mínimo para los valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

	$\frac{\mu}{\mu_m}$	tiempo de ciclo (segundos)
10.	superior a 0,5	40
	0,2	120
	0,1	230
	0,05	450
	0,02	1000
15.	inferior a 0,01	2000

20. Con preferencia, y en el cuarto aspecto, el tiempo de ciclo mínimo para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  es el tabulado a continuación, estando el tiempo mínimo para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos mínimos para dicho par:

	$\frac{\mu}{\mu_m}$	tiempo de ciclo (segundos)
	superior a 0,5	65
	0,2	170
25.	0,1	350
	0,05	700
	0,02	1800
	inferior a 0,01	3600

30. El cuarto aspecto de la invención se puede utilizar en los procedimientos para la producción de proteínas de célula única, preferiblemente en procedimientos que utilizan fermen-

tadores como los descritos anteriormente en conexión con la primera modalidad. Sin embargo, el cuarto aspecto se utiliza más convenientemente en procesos para la producción de metabolitos extracelulares o intracelulares, por ejemplo, ácido cítrico, aminoácidos y sustancias antibióticas. Estos procedimientos se efectúan también convenientemente en los fermentadores mencionados anteriormente en conexión con el primer aspecto.

5.

Con preferencia, en el cuarto aspecto de la invención, se suministra energía, normalmente fuente carbonada, al cultivo en impulsos regulares.

10.

Los aspectos segundo, tercero y cuarto, se pueden realizar en cualquier aparato adecuado incluyendo reactores de tipo tanque y en aparatos en donde el cultivo fluye a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos. Debe

15.

entenderse que cuando el aparato es un reactor tipo tanque, el líquido o fuente de energía se suministra al cultivo del mismo en impulsos en uno o más puntos y que cuando el cultivo fluye a lo largo de una trayectoria definida por límites físicos, el líquido o fuente de energía se suministra al cultivo que fluye a lo largo de la trayectoria en uno o más puntos, de forma

20.

continua y/o por impulsos.

De este modo, el proceso de la invención es aplicable ampliamente y resulta muy útil en aquellos procedimientos que comprenden el cultivo continuo de microorganismos. Se puede utilizar para aumentar o disminuir la eficacia de producción de células en términos de energía utilizada, en función del tipo de proceso en el cual se utiliza.

25.

Para la producción de proteína de célula única o metabolitos celulares, esta eficacia deberá ser maximizada. Como anteriormente se ha mencionado, dicha eficacia debe reducirse al

30.

mínimo en el caso de tratamiento de aguas residuales y en la producción de disolventes orgánicos.

5. La fuente de energía es adecuadamente una fuente carbonada. Sin embargo, puede ser una fuente ligera en una reacción fotosintética o hidrógeno en cultivos que pueden utilizar el hidrógeno como fuente de energía y otras fuentes de energía inorgánicas reducidas en microorganismos quemolitrópicos.

10. Los experimentos que han sido realizados y a partir de los resultados obtenidos se derivan los gráficos mostrados en las figuras 1 y 3 de los dibujos, son basicamente de cuatro tipos:

15. 1. Experimentos en los cuales un cultivo de microorganismos se hace circular alrededor de un sistema que comprende un par de fermentadores idénticos enlazados. Se suministra una fuente de carbono al cultivo de diversos modos, especialmente:

- (a) A una velocidad igual para cada fermentador.
- (b) A un fermentador solamente.
- (c) A cada fermentador pero siendo la velocidad para un fermentador distinta de la del otro.

20. 2. Experimentos en los cuales se impulsa una fuente de carbono en una serie de distintos modos a un cultivo en un fermentador de laboratorio convencional de dos litros.

25. 3. Experimentos en los cuales se alimenta continuamente una fuente de carbono a una serie de puntos en un fermentador circulatorio de 50.000 litros de capacidad.

4. Experimentos en los cuales se alimenta agua residual a un sistema de lodo activo circulatorio de 20000 litros de capacidad.

30. En un cultivo continuo, en donde se suministran organismos de crecimiento con una fuente de carbono y/o energía

de modo que se presenten periodos de inanición de energía, se cree que cuando se suministra energía a las células después de un periodo de inanición de energía, se emplea inicialmente una proporción de la energía suministrada por las células en un periodo de adaptación a un estado de crecimiento y, por lo tanto, no es disponible eficazmente para un crecimiento eficaz. Esto representa una caída global en la eficacia de producción de biomasa en términos de la fuente de energía consumida en un periodo prolongado.

5.

10.

Puede argumentarse que las células sometidas a un verdadero suministro continuo de una fuente de energía, tal como una fuente de carbono, crecen en un verdadero estado constante cuando los conjuntos de metabolitos y actividades enzimáticas se encuentran a niveles eficazmente constantes comensurados con una formación de biomasa eficaz. Dichos cultivos pueden hacerse ineficaces suministrando la fuente de energía por impulsos separados en intervalos de tiempo. La relación de eficacia introducida, se puede definir ampliamente mediante una ecuación de la forma simplificada:

15.

20.

$$X/(X + fY\mu_m/\mu t)$$

en donde X se relaciona con la energía requerida para una biosíntesis útil bajo condiciones constantes de crecimiento a una velocidad igual a  $\mu_m$ , la cantidad Y está relacionada con la energía requerida para reorganizar el aparato metabólico después de un periodo prolongado de indisponibilidad de energía exógena,  $t$  es el tiempo de ciclo como anteriormente se ha definido y  $f$  es un factor que oscila entre 0 y 1 y que describe la proporción de la energía reorganizacional requerida como una función del tiempo agotado sin energía exógena disponible.

25.

30.

Cuando el término  $\frac{fY\mu_m}{\mu}$  es pequeño, la relación de

5. eficacia se aproxima a la unidad. Esto se puede conseguir mediante: aumento de  $\mu$  a  $\mu_m$  constante; disminución de  $\mu_m$  a  $\mu$  constante o mediante el valor de la función  $f$  que cambia con el tiempo de ciclo. La función  $f$  es una función compleja que describe la fracción de conjuntos metabólicos degradados durante un periodo sin energía exógena disponible y que como tal contiene; constantes de velocidad ( $k$ ) para conjuntos metabólicos; un tiempo de respuesta ( $t_r$ ) entre el agotamiento de energía y el inicio de la degradación de metabolitos; el tiempo de ciclo total ( $t$ ) y el factor de crecimiento proporcional  $\mu/\mu_m$ ;

10. Suponiendo que después del agotamiento del suministro de energía, el organismo permanezca sin afectar durante un tiempo de respuesta ( $t_r$ ) y después de utilizarse los conjuntos de metabolitos a una velocidad proporcional a su concentración residual, se puede demostrar entonces que:

$$f = 1 - \exp (kt_r - kt (1 - \mu/\mu_m))$$

15. (a condición de que  $f = 0$  se sustituye cuando se derivan valores inferiores a cero).

20. Esto es como máximo una aproximación pero proporciona una buena representación, excepto al final del tiempo de respuesta cuando se predice un cambio instantáneo desde cero a una velocidad finita de utilización de metabolitos. Esto no está de acuerdo con el presente entendimiento de los sistemas microbiológicos reales, por lo que se ha impuesto cierto allanamiento de la función en esta región.

25. Cuando el valor de  $f$  se introduce en la ecuación:

$$\text{Relación de eficacia} = X/(X + fY \mu_m/\mu t)$$

30. la ecuación resultante describe una serie de líneas como las mostradas en la figura 2. Todos nuestros datos se encuentran en estas líneas.

En la figura 1, la primera región del gráfico previamente descrito se interpreta del siguiente modo: Para estos tiempos de ciclo cortos, la influencia del tiempo de respuesta aplazado de los organismos es tal que  $f$  tiende a cero y la relación de eficacia se encuentra en un máximo. En la segunda región del gráfico,  $f$  ha incrementado debido a que el tiempo de ciclo excede ahora sustancialmente al tiempo de respuesta del organismo y de este modo disminuye la relación de eficacia. Sin embargo, a medida que  $t$  continua aumentando disminuye la influencia de  $f$  sobre la ecuación y  $t$  se convierte en la influencia dominante con el resultado de que aumenta la relación de eficacia. En esta región, el gráfico típico para impulsos regulares diverge de aquel utilizado para impulsos irregulares como en la figura 3.

Para impulsos regulares, la aproximación a un valor constante se desplaza hacia tiempos de ciclo más corto. La razón de esta última observación consiste probablemente en que las oscilaciones naturales de frecuencia regular que utilizan las células para regular eficazmente las actividades metabólicas, pueden ser atrapadas por la frecuencia constante correcta de impulsos del sustrato (es decir impulsos regulares). Cuando se utilizan impulsos irregulares, la frecuencia constante natural de las oscilaciones metabólicas se destruye y se presentan variaciones ineficaces al azar de la actividad. La experiencia con cultivos puros que crecen sobre una única fuente de energía (organismo proteínico) sobre metanol y cultivos mixtos (procariotos y eucariotos) que crecen sobre una fuente de energía mixta (efluente doméstico), demuestra que la teoría y la práctica se acoplan al modelo matemático que se ha derivado en esta invención. Se cree que la teoría es aplicable a la mayoría de

microorganismos que crecen del cultivo continuo de energía limitada, habiendose denominado dicha teoría como " Teoría de pérdida de energía por reorganización".

EJEMPLO 1

- 5. Se hace crecer un cultivo de Methylophilus methylotrophus en un pequeño fermentador de ciclo a presión (tal como el descrito en la patente británica nº 1.353.008) de 165 litros, trabajando con volumen líquido a 40°C y  $D= 0,25 h^{-1}$ . El medio es el descrito como medio I en la patente británica nº 1.370.892. La velocidad de circulación dentro del fermentador es de  $30m^3h^{-1}$  proporcionando un tiempo medio de circulación de 20 segundos. El peso en seco de las células está relacionado con la velocidad de adición de metanol, de modo que 14 g/l constituye la concentración constante de las células secas. Se distribuyen cinco puntos de adición de metanol alrededor del fermentador de modo que, mientras los flujos de metanol a través de cada punto son diferentes, los flujos de metanol son proporcionales al volumen de líquido contenido en aquella porción del fermentador.
- 10.
- 15.
- 20. La distribución física de los puntos de adición del metanol es tal que las células en circulación se someten a un círculo consecutivo de presencia y ausencia de sustrato cada 3 segundos o a un ciclo similar cada 20 segundos cuando se añade en un punto la totalidad del metanol suministrado al fermentador. Los resultados se muestran en la tabla I.
- 25.

TABLA I

Tiempo de ciclo de adición de metanol	C a cells <sup>1</sup>	C a CO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	C S/N <sup>3</sup>
20 segundos	57,8	38,6	4,3
3 segundos	65,1	30,9	3,2

30.

1. C a células representa el porcentaje de carbono metanólico convertido a carbono celular.

2. C a CO<sub>2</sub> representa el porcentaje de carbono metanólico convertido a carbono CO<sub>2</sub>.

5. 3. C a S/N representa el porcentaje de carbono metanólico convertido a carbono sobrenadante.

EJEMPLO 2

10. Un cultivo de Methylophilus methylotrophus en fermentador de laboratorio continuo (volumen líquido 1,5 litros y peso seco constante 10 g/l) se desarrolla a diversas velocidades de dilución con flujos constantes de medio. Se utiliza un sistema de adición separada para metanol de modo que el metanol suficiente requerido para el ejemplo, 3 segundos de crecimiento a  $\mu = 0,2h^{-1}$  pueda suministrarse como un impulso de metanol suministrado en 0,3 segundos. Esta relación del tiempo de suministro al tiempo de ciclo total se mantiene en 1 a 10 durante todas las variaciones del tiempo de ciclo. La composición media y condiciones de crecimiento son iguales a las descritas en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

20.	Velocidad de dilución (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de ciclo (segundos)	MC células (%)
	0,07	2,75	56,2
		5,5	49,3
		11,0	47,5
		22,0	42,3
25.	0,20	1,0	64,4
		2,0	62,4
		2,5	61,0
		3,0	59,5
		4,0	54,5
		8,0	53,0
		11,0	47,1
30.		20,0	46,2

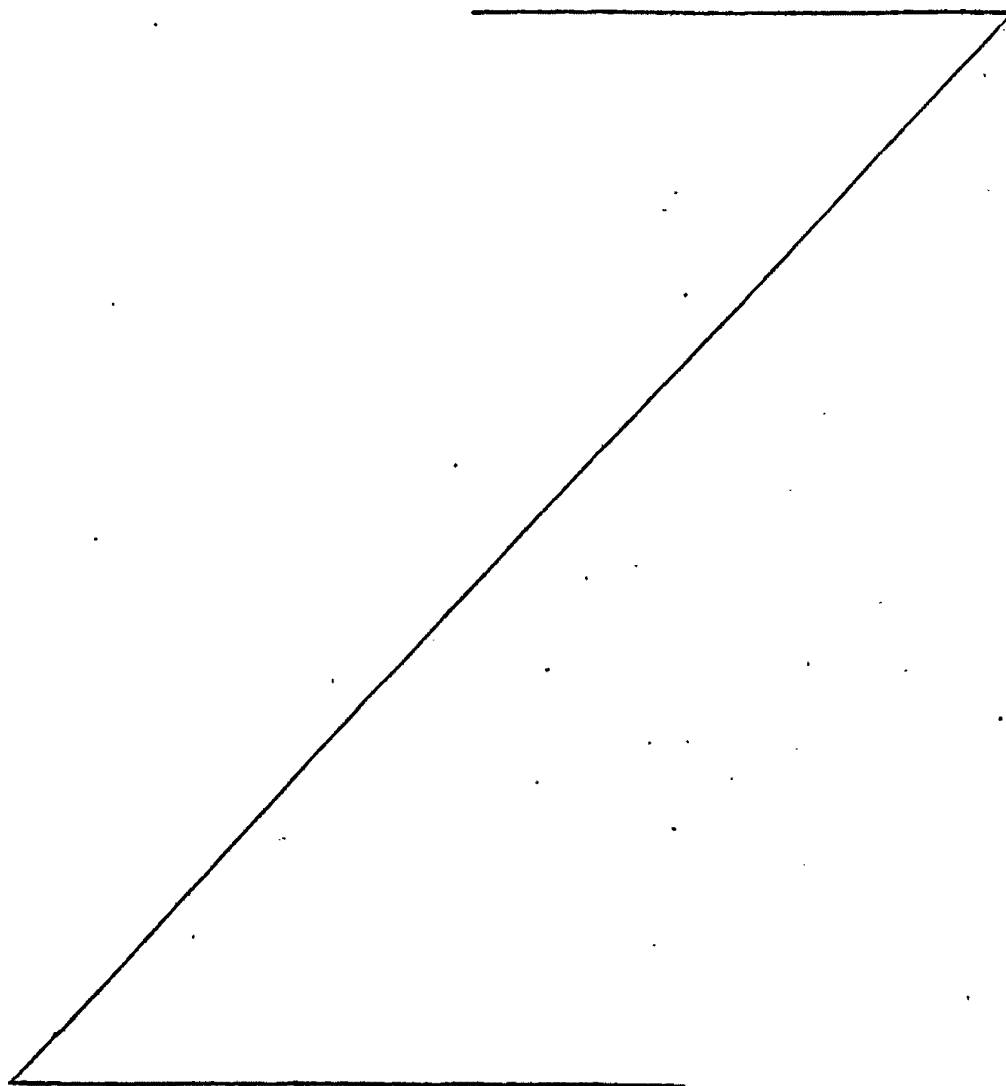
	33,0	48,8
0,4	2,75	62,1
	5,5	61,5

\* % (p/p) de carbono metanólico incorporado en carbono celular.

5. El contenido en carbono de las células permanece constante durante todo el experimento.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.

10.



REIVINDICACIONES

- 1ª.- Procedimiento para el cultivo de células, caracterizado porque se hace fluir un cultivo de células a lo largo de una trayectoria definida por constreñimientos físicos y se suministra una fuente de energía al cultivo en una o más posiciones, haciendo con ello que las células individuales del cultivo, a medida que fluyan a lo largo de la trayectoria, se expongan a cambios de concentración que o bien son eficazmente negligibles o bien son equivalentes a una fuente impulsada de energía, de modo que el tiempo de ciclo sea eficazmente cero o caiga dentro de la primera región de un gráfico del tiempo de ciclo contra la proporción de eficacia de biomasa bajo las condiciones ambientables aplicables al cultivo, o caiga en la parte de una segunda región del gráfico inmediatamente después de la primera región, y de modo que la proporción de eficacia de energía se encuentre dentro del 15 % del valor en la primera región.

- 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el tiempo de ciclo es o bien eficazmente cero, o bien, a un valor determinado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , no sea superior a los valores indicados en la siguiente tabla, estando los tiempos máximos de ciclo, para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

25.	$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
	Superior a 0,5	30
	0,2	6
	0,1	4
	0,5	3
30.	inferior a 0,02	2,5

3<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el tiempo de ciclo, a un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , no es superior a los valores indicados en la siguiente tabla, estando los tiempos máximos de ciclo, para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados, en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
superior a 0,5	15
0,2	5
0,1	3,5
0,05	2,5
inferior a 0,02	2

4<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la producción de proteínas de célula única, se cultivan microorganismos sobre una fuente de carbono adecuada.

5<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la fuente de carbono es metanol.

6<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fuente de energía se suministra al cultivo en una pluralidad de puntos alrededor de la trayectoria.

7<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque las células pertenecen a la especie Methilophilus methylotrophus (anteriormente conocida como Pseudomonas methylotropha).

8<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque las células pertenecen a cualquiera de las cepas NCIB nos. 10508 a 10515 y 10592 a 10596.

9.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se suministra una fuente de energía continuamente y/o en impulsos al cultivo, en uno o más posiciones, haciendo con ello que las células individuales del cultivo se expongan a una fuente impulsada de energía o a cambios de concentración equivalentes a una fuente impulsada de energía, la cual es tal que el tiempo de ciclo cae dentro de la tercera región de un gráfico del tiempo de ciclo contra la proporción de eficacia de biomasa bajo las condiciones ambientales aplicables al cultivo, o cae en la parte de la segunda región del gráfico inmediatamente anterior a la tercera región, y es tal que la proporción de eficacia está dentro del 15 % del valor de la tercera región.

10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el tiempo de ciclo, para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , se encuentra dentro de una gama entre el valor mínimo tabulado a continuación y un valor máximo en el cual cae la eficacia global del cultivo y mueren en números apreciables los microorganismos presentes en el cultivo, estando los mínimos para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados en proporción lineal a los tiempos de ciclo para dicho par:

$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
Superior a 0,5	40
0,2	120
0,1	230
0,05	450
0,02	1000
Inferior a 0,01	2000

5 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el tiempo mínimo de ciclo, para un valor dado de  $\frac{\mu}{\mu_m}$ , es el tabulado a continuación, estando el tiempo mínimo para valores de  $\frac{\mu}{\mu_m}$  que caen entre cualquier par sucesivo de los valores tabulados en proporción lineal a los tiempos mínimos para dicho par:

	$\frac{\mu}{\mu_m}$	Tiempos de ciclo (segundos)
	Superior a 0,5	65
	0,2	170
10	0,1	350
	0,05	700
	0,02	1800
	Inferior a 0,01	3600

15 12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque se lleva a cabo para la producción de metabolitos extracelulares o intracelulares.

13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fuente de energía es una fuente de carbono.

20 14.- Procedimiento para el cultivo de células, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 29 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 31 MAR. 1978

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED

*[Faint text, possibly a signature or stamp]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

FIG. 1.

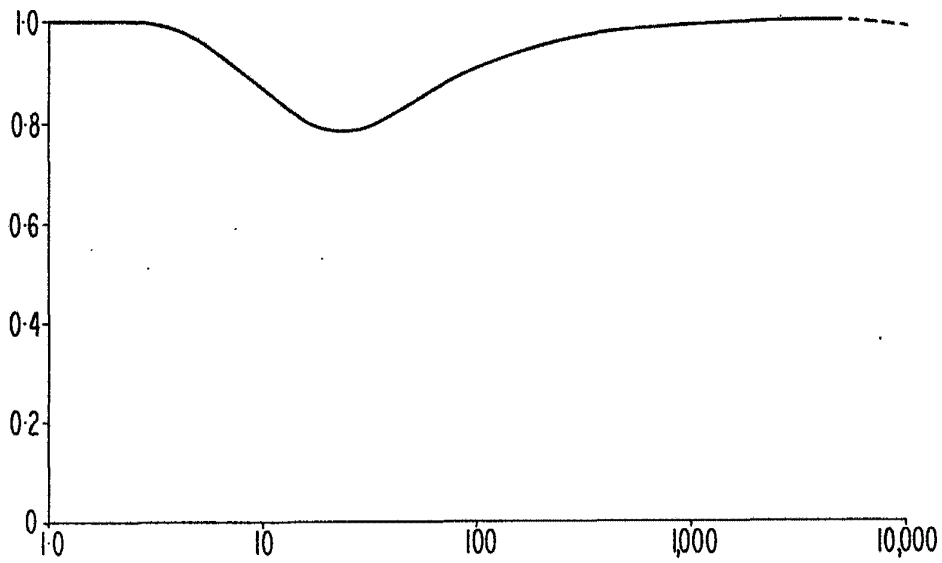


FIG. 2.

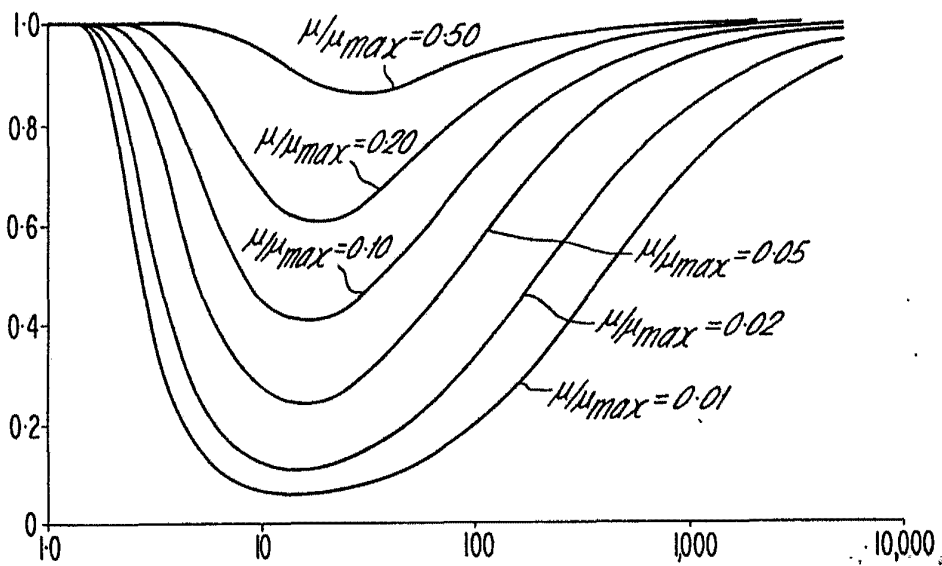
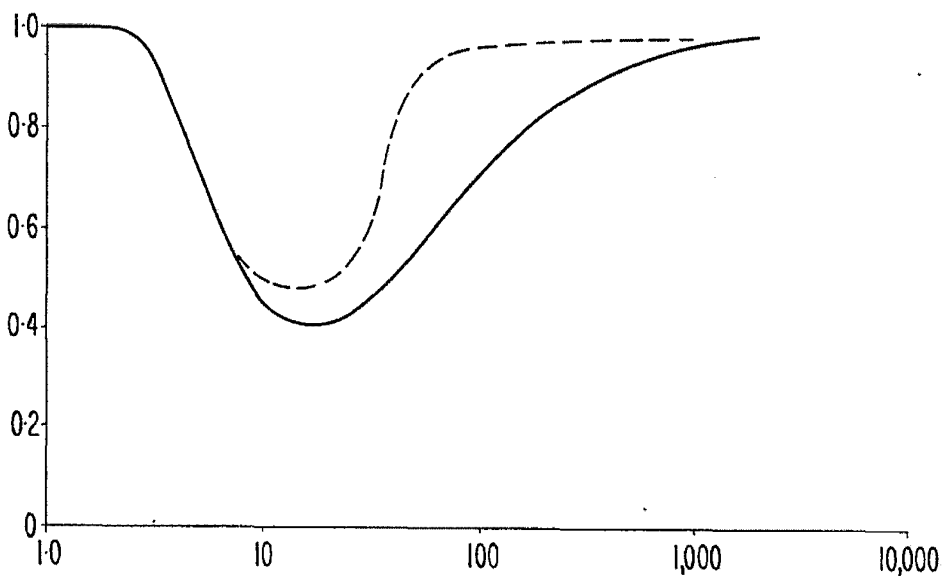


FIG. 3.



ESCALA  
VARIABLE

~~MADE~~