



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 178**

51 Int. Cl.:
C12P 17/12 (2006.01)
C07D 239/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **01989605 .9**
86 Fecha de presentación : **19.12.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1343907**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación biotecnológica continua de solutos compatibles a partir de sustancias tóxicas.**

30 Prioridad: **21.12.2000 DE 100 65 071**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Helmholtz-Zentrum für
Umweltforschung GmbH-UFZ
Permoserstrasse 15
04318 Leipzig, DE**

72 Inventor/es: **Babel, Wolfgang;
Kleinsteuber, Sabine y
Maskow, Thomas**

74 Agente: **Forteo Laguna, Juan José**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la fabricación biotecnológica continua de solutos compatibles a partir de sustancias tóxicas.

5 La presente invención se refiere a la síntesis biotecnológica de solutos compatibles de sustratos escogidos entre hidrocarburos o materiales aromáticos alifáticos C1 y C2, o bien sustratos ecotóxicos, que son potencialmente tóxicos, y que, cuando son utilizados como fuente de carbono y energía para crecimiento y multiplicación, muestran el fenómeno de inhibición de crecimiento (reducción del crecimiento del sustrato) incluso para pequeñas concentraciones.

10 La capacidad de mantener el equilibrio osmótico con respecto al medio circundante mediante la síntesis de solutos compatibles está muy extendida en bacterias, hongos, levaduras, algas, algas rojas u organismos superiores (Brown 1976). Está acoplada o bien a un determinado sustrato o a un determinado tipo de nutrición. Los solutos compatibles pueden ser conseguidos tanto mediante fototrofos o quimiolitotrofos de CO₂, y también de compuestos orgánicos quimiorganoheterótrofos. Además de azúcares y alcoholes se pueden tener en consideración principalmente compuestos orgánicos tal como hidrocarburos, ácidos orgánicos o compuestos aromáticos. Hasta el momento, se han probado
15 numerosas sustancias dependiendo principalmente del tipo y composición de los solutos compatibles sintetizados de los organismos, de la fuente de carbono y del tipo de preparación de energía. Pertenecen a los solutos compatibles diferentes sustancias (Galinski 1995), entre ellas disacáridos, ácidos de tetrahidropirimidina, betaína, glicerol, glucosilglicerol, dimetilsulfoniopropionato, prolina, Nδ-acetilornitina, Nε-acetilisina, Nα-carbamoilglutaminamida, Nα-acetilglutaminilglutaminamida.
20

Son conocidos procedimientos económicos para la síntesis biotecnológica de algunos solutos compatibles. Los solutos de síntesis compatibles están unidos frecuentemente a las características enzimáticas de microorganismos vivos. En principio, existen dos procedimientos de síntesis para estas sustancias. El primero utiliza organismos modificados genéticamente GVO, que producen en exceso solutos compatibles y se mezclan en el medio hasta concentraciones de 0,1 M (Grammann y otros, 2001). El segundo procedimiento (Galinski y otros, 1992, Sauer and Galinski 1997), el ordeño bacteriano ("bacterial milking"), basado en la capacidad de las bacterias alofílicas de superar el estrés de dilución, por la separación rápida de solutos compatibles para evitar de esta manera la rotura de las celdas. Por un cambio cíclico con una fase de síntesis generada por una elevada concentración de sales, se puede organizar el procedimiento de forma económica. En la fase de síntesis se tiene interés en elevadas tasas de conversión, que permiten elevadas concentraciones de sustratos. Dado que muchas sustancias, incluso glucosa, reducen el crecimiento a elevadas concentraciones, para conseguir a pesar de ello elevadas densidades de células, se puede colaborar con velocidades de alimentación exponencialmente y continuamente crecientes (Keller y Dunn 1978). Los sustratos que muestran el fenómeno de inhibición de exceso de crecimiento del sustrato, incluso para concentraciones reducidas, no son apropiados.
30

35 Tal como es sabido, las sustancias potencialmente tóxicas presentan un problema para la eliminación de los materiales.

De manera sorprendente se ha descubierto que solutos compatibles pueden ser fabricados alternativamente a dichas sustancias potencialmente tóxicas, tales como son: cuerpos tóxicos C1 y C2, hidrocarburos, o también sustancias ecotóxicas, tales como fenoles o benzoatos. De acuerdo con la invención, se ha desarrollado un régimen de proceso que posibilita la síntesis de solutos compatibles, preferentemente a base de productos químicos tóxicos en bruto ("Bulkchemicals") o bien productos residuales y materiales sobrantes de la industria química y de la agricultura.

45 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención un procedimiento con el que es posible fabricar solutos compatibles a base de sustancias tóxicas, en el que microorganismos alofílicos correspondientes que utilizan estos sustratos, se multiplican de manera continua, de forma tal que se puede mantener la producción de calor poco antes de una disminución rápida. En este punto el contenido de solutos compatible es máximo. La composición de dos corrientes de sustrato Se controla mediante la variación adecuada para un reducido intercambio volumétrico. Para la síntesis entran en consideración los microorganismos alofílicos que no presentan exigencias en cuanto a los nutrientes, crecen con rapidez y sintetizan el producto deseado con elevadas concentraciones. De acuerdo con la invención, el procedimiento está dirigido a los llamados agentes orgánicos o químico-orgánicos, que presentan características citotóxicas y que no son recalitrantes.
50

55 El procedimiento objeto de la presente invención para la fabricación continua de tipo biotecnológico de solutos compatibles se caracteriza, por lo tanto, por el hecho de que los organismos alofílicos se multiplican de manera continuada sobre sustratos escogidos a base de cuerpos C1 y C2 tóxicos, hidrocarburos o productos aromáticos de sustratos ecotóxicos que muestran inhibición de crecimiento en exceso de sustrato incluso para pequeñas concentraciones, de manera que se controla la producción de calor y después de alcanzar una situación extraordinaria poco antes de su disminución rápida, de tipo brusco son mantenidos de manera que, en una segunda corriente del sustrato, son dosificados de manera que se regula el contenido de sal, de forma que se pueden constituir los solutos correspondientes. La fabricación continuada tiene lugar en una zona de temperaturas comprendida entre 10 y 90°C y para valores de pH comprendidos entre 3 y 11 de forma aeróbica, microaeróbica y anaeróbica. Preferentemente, se multiplican especies del tipo de las halomonas sobre fenol, ácido benzoico o metanol.
60

65 En especial, se multiplican las especies del tipo de halomonas sobre fenol con velocidades de paso entre 0,07 y 1,5 g l⁻¹ h⁻¹ y con velocidades de crecimiento entre 0,03 y 0,5 h⁻¹ para un valor de pH comprendido entre 8 y 11. En otras variantes de realización, las especies del tipo de halomonas son multiplicadas sobre ácido benzoico con

velocidades de paso comprendidas entre 0,07 y 3 g l⁻¹ h⁻¹ y con velocidades de crecimiento específicas entre 0,03 y 0,5 h⁻¹ o bien sobre metanol con velocidades de paso entre 0,07 y 6,0 g l⁻¹ h⁻¹ y con velocidades de crecimiento específicas entre 0,03 y 0,2 h⁻¹, de manera correspondiente, para un valor de pH comprendido entre 8 y 11.

En una forma de realización especialmente preferente de la invención, se efectúa la multiplicación de un aislado alcalifílico del tipo de halomonas (EF11) con velocidades de consumo de fenol de 0,3 a 1 g l⁻¹ h⁻¹ con una velocidad comprendida entre 0,05 y 3 h⁻¹. En una segunda forma preferente, otro aislado alcalifílico, del tipo halomonas (D10) es multiplicado con velocidades de consumo de ácido benzoico de 0,3 a 1,5 g l⁻¹ h⁻¹ con una velocidad entre 0,05 y 0,4 h⁻¹.

El procedimiento según la presente invención utiliza fuentes de carbono económicas escogidas entre cuerpos tóxicos C1 y C2, hidrocarburos y también sustratos ecotóxicos tales como fenol o benzoatos. Tiene, por lo tanto, la gran ventaja de que consigue una eliminación de sustancias problemáticas en una síntesis simultánea de materiales valiosos.

Se pueden utilizar sustancias tóxicas que muestran el fenómeno de inhibición del crecimiento de sustratos, incluso para concentraciones reducidas. Propiamente no son apropiadas dentro de los conceptos aceptados hasta el momento para procedimientos microbiológicos para la fabricación de solutos compatibles, puesto que no se pueden alcanzar condiciones de espacio y tiempo económicas con dichas sustancias ni en procedimientos por lotes ni en procedimientos semilotes ("Fed-Batch") o en procesos de tipo continuo, puesto que no se puede solucionar la contradicción entre velocidades elevadas de producción a base de elevadas concentraciones de sustrato e inhibición de los mismos por efectos citotóxicos. De acuerdo con la invención, se pueden eliminar de manera fácil cuerpos C1 reducidos, tales como formaldehído y también acetaldehído, ácido acético, hidrocarburos alifáticos o aromáticos, tales como fenoles, ácidos fenoxialcanos, ácido benzoico y benzaldehído, de manera que, en especial estos últimos, son conocidos por su efecto bacteriocida, apareciendo frecuentemente componentes sustanciales en las aguas residuales de tipo industrial.

Referencias de la literatura

Brown AD (1976) Microbial Water Stress. *Bacteriological Reviews* ("Estrés de aguas microbianas. Resúmenes bacteriológicos") 40: 803-846.

Galinski EA (1995) Osmoadaptation in Bacteria ("Osmoadaptación en bacterias"). *Adv Microbial Physiol* 37: 273-328.

Galinski EA, Trüper H-G, Sauer T (1992) Verfahren zur *in vivo* Gewinnung von Inhaltsstoffen aus Zelle ("Procedimiento para la obtención *in vivo* de sustancias contenidas a partir de células"). DE 4244580 Al.

Grammann K, Volke A, Kunte HJ (2001) Identification and Characterization of the Osmoregulated Ectoine Transport System TeaABC in *Halomonas elongata* DSM 2581^T ("Identificación y caracterización del sistema de transporte de ectoína osmorregulado TeaABC en *halomonas elongata* DSM 2581^T") In: *Halophiles2001*, Sevilla, España, 23.-27.09.2001 Seite L42.

Keller R, Dunn IJ (1978) Fed-batch microbial culture: models, errors and applications ("Cultivo microbiano en semilotes: modelos, errores y aplicaciones"). *J appl Chem Biotechnol* 28: 508-514.

Sauer T, Galinski EA (1997) Bacterial Milking: A Novel Bioprocess for Production of Compatible Solute ("Ordeño bacteriano: nuevo bioproceso para la producción de solutos compatibles"). *Biotechnology and Bioengineering* 57: 306-313.

A continuación, la invención se explicará de manera más detallada en base a ejemplos de realización, sin que ello sirva de limitación.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Se utiliza para este ejemplo un aislado (EF11) de un lago alcalino húngaro, al que corresponde el tipo de halomonas. El cultivo tiene lugar de manera continua en un biorreactor térmicamente aislado que tiene un contenido de 2,2 l a un pH de 9,0 y 30°C de temperatura. Todos los demás medios utilizados en este ejemplo contienen 3 g KCl, 0,5 g NH₄NO₃, 0,3 g (NH₄)₂SO₄, 0,4 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,3 g NaH₂PO₄ 1 0,033 ml Extran[®] AP31 Eliminador de espuma, 1,8 mg FeCl₂ x 4 H₂O, 0,25 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 0,01 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 0,01 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 0,07 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 0,1 mg ZnCl₂, 0,5 mg H₃BO₃, 0,03 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,01 mg Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,02 mg Biotina, 0,02 mg Ácido fólico, 0,1 mg Piridoxina-HCl, 0,05 mg tiamina-HCl x 2 H₂O, 0,05 mg riboflavina, 0,05 mg de ácido nicotínico, 0,05 mg D-pantotenato cálcico, 0,001 mg de vitamina B₁₂, 0,05 mg de ácido p-aminobenzoico, 0,05 mg de ácido lipónico en 1 l de agua destilada. El biorreactor se llenará con 1,7 l de medio de nutrición con 150 mg/l de fenol con 3% (peso/volumen). Un medio de refrigeración somete al reactor a un flujo térmico constante en el tiempo, y la temperatura del reactor se mantiene constante mediante un calentador eléctrico. El aire para la gasificación es saturado mediante una cascada de recipientes de lavado con vapor de agua a la temperatura del reactor y con una velocidad de desgasificación de 0,1 m³ h⁻¹ (referido a 101,325 KPa y 25°C). La homogeneización tiene lugar mediante una turbina

ES 2 287 178 T3

Rushton con 900 revoluciones por minuto. El medio de alimentación y NaOH 1N para neutralización son llevados a la temperatura del reactor mediante un cambiador de calor. 300 ml de un cultivo previo, llevado por lotes a una densidad de biomasa de 0,5 g/l, actúa como inóculo. La potencia calorífica, que es necesaria para mantener constante la temperatura del reactor, se reduce a la producción de calor de los microorganismos tan pronto como estos empiezan a utilizar el fenol. De manera inmediata, cuando disminuye la producción de calor y de esta manera se reduce el consumo de fenol, se inicia un nuevo crecimiento mediante una porción de 20 ml del medio con 6,3 g/l de fenol. Por repetición del proceso se consigue una densidad de biomasa de 2 g/l aproximadamente, y finalmente el medio es alimentado de manera continua con 0,14 l h⁻¹ y ajustado con un nivel de llenado de reactor de 2 l. Después de unas 30 horas, muestra una producción de calor constante de unos 3,6 vatios, que se ha alcanzado en una situación estacionaria. La concentración residual de fenol en el biorreactor es entonces menor de 0,1 mg/l. Posteriormente, el contenido de sal del medio se aumentará o bien por la alimentación separada de dos medios con distintos contenidos de sal o mediante un sistema mixto de manera lenta y continuada. Este sistema de tipo mixto puede comprender, por ejemplo, una botella de mezcla que almacena el fermentador con 0,14 l h⁻¹ (concentración de sal empezando en 8,5 (peso/volumen) %) y una botella receptáculo (concentración de sal 25 (peso/volumen) %) la cual alimenta nuevamente la botella de mezcla con 0,07 l h⁻¹. La producción de calor aumenta de forma lineal, hasta que lleva a una reducción acelerada y brusca de la producción de calor. Este punto se presenta después de 35 horas. Se caracteriza por una producción de calor de 2,7 W, una densidad de biomasa de 1,5 g/l con un contenido de ectoína de 17% (peso/peso) y de hidroxiectoína de 1% (peso/peso). Para estabilización se interrumpe la alimentación desde la botella de recipiente y se facilita 1% en volumen de un medio libre de sales a la botella de mezcla.

Ejemplo 2

El asilado (EF11) se multiplica de manera continua igual que en el Ejemplo 1. Las velocidades de flujo son, no obstante, de la botella recipiente a la botella de mezcla de 0,03 l h⁻¹ y de la botella de mezcla al biorreactor de 0,06 l h⁻¹. La caída acelerada de la producción de calor se presenta después de unas 73 horas. Se caracteriza por una producción de calor de 1,4 W, una densidad de biomasa de 1,7 g/l con un contenido de ectoína de 18% (peso/peso) y un contenido de hidroxiectoína de 0,5% (peso/peso).

Ejemplo 3

El aislado (D10) es cultivado de manera continua de forma análoga al ejemplo 1. Los medios contienen, no obstante, 10 g/l de benzoato sódico. El punto de inflexión en la producción de calor se presenta después de 40 horas y corresponde a una producción de calor de 3,0 W, una densidad de biomasa de 3,4 g/l con un contenido de ectoína de 15% (peso/peso).

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción biotecnológica continua de solutos compatibles, **caracterizado** porque microorganismos alofílicos son cultivados de manera continua sobre sustratos seleccionados a partir de sustancias C_1 y C_2 tóxicas, hidrocarburos alifáticos o sustancias aromáticas o sustratos ecotóxicos que muestran inhibición de crecimiento incluso para bajas concentraciones, en cuyo método se controla la producción de calor y, después de alcanzar un régimen estable, es mantenida en una zona próxima a la disminución rápida y brusca de la misma por alimentación de un segundo flujo de sustrato que regula el contenido de sal, de manera que se forman los solutos respectivos.

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la producción continua es llevada a cabo en una gama de temperatura comprendida entre 10 y 90°C a valores de pH entre 3 y 11 en condiciones aeróbicas, microaeróbicas o anaeróbicas.

3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque se utilizan bacterias del género halomonas como microorganismos.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se utilizan como sustratos tóxicos formaldehído, acetaldehído, ácido acético, metanol, fenoles, ácidos fenoxialcanoicos, ácido benzoico y benzaldehído.

5. Método, según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque la especie de halomonas son cultivadas en fenol con caudales comprendidos entre 0,07 y 1,5 g l⁻¹ h⁻¹ y con velocidades de crecimiento específico comprendidas entre 0,03 y 0,5 h⁻¹ a un valor de pH entre 8 y 11.

6. Método, según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se cultiva un aislado alcalifílico con velocidades de consumo de fenol de 0,3 a 1 g l⁻¹ h⁻¹ a una velocidad entre 0,05 y 0,3 h⁻¹.

7. Método, según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque la especie del género halomonas se cultiva en ácido benzoico con caudales comprendidos entre 0,07 y 3 g l⁻¹ h⁻¹ y con velocidades de crecimiento específicas entre 0,03 y 0,5 h⁻¹ con un valor de pH entre 8 y 11.

8. Método, según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el aislado alcalifílico es cultivado con velocidades de consumo de ácido benzoico de 0,3 a 1,5 g l⁻¹ h⁻¹ y a una velocidad de 0,05 a 0,4 h⁻¹.

9. Método, según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque la especie del género halomonas se cultiva sobre metanol con velocidades de flujo comprendidas entre 0,07 y 6,0 g l⁻¹ h⁻¹ y con una velocidad de crecimiento específica entre 0,03 y 0,2 h⁻¹ con valor de pH entre 8 y 11.