

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 512**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2014 PCT/EP2014/064800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2014 E 14739774 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 3019590**

54 Título: **Nuevo procedimiento para el cultivo de microorganismos por confinamiento en micro-biorreactores**

30 Prioridad:

10.07.2013 FR 1301631

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.12.2017

73 Titular/es:

**ETABLISSEMENTS J. SOUFFLET (25.0%)
Quai du Général Sarrail
10400 Nogent Sur Seine, FR;
ECOLE SUPÉRIEURE DE PHYSIQUE ET DE
CHIMIE INDUSTRIELLES DE LA VILLE DE PARIS
(25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%) y
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GARNICA RODRIGUEZ, JAIRO IVAN;
BOITARD, LAURENT;
DREVELLE, ANTOINE SERGE DOMINIQUE y
BIBETTE, JÉRÔME**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 647 512 T3

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

Nuevo procedimiento para el cultivo de microorganismos por confinamiento en micro-biorreactores.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para el cultivo de microorganismos por confinamiento en micro-biorreactores.

De manera más precisa, la presente invención permite seguir de manera cinética y en largos plazos de incubación (>24h), el cultivo de microorganismos en medio confinado.

10 Se conoce, en particular por la solicitud de patente francesa nº 11/00659, proceder al cultivo en medio confinado de microorganismos; esta solicitud describe en particular un procedimiento y un dispositivo de seguimiento de la reacción cinética con un confinamiento de los microorganismos en depósitos acuosos. Este procedimiento se basa en la referenciación de la secuencia de los depósitos acuosos dentro de una sucesión de depósitos acuosos separados por un fluido espaciador y transportado por un fluido portador en un tubo. Sin embargo, dicho procedimiento no permite estudiar unos microorganismos cuyo crecimiento o actividad biológica modificará las interfaces. En efecto, en estos casos, después de 24h, ya no se conserva la integridad de los depósitos: o bien se fusionan entre sí, o bien se subdividen en depósitos más pequeños. La interpretación de los resultados del experimento ya no es posible desde el momento en que se pierde por lo menos uno de los depósitos, perdiéndose también la referenciación y/o cuando varía el tamaño de uno de dichos depósitos, por ejemplo debido a que tiene una fuga; en este último caso, la concentración en metabolito, que se mide en el interior, aumentará artificialmente por efecto de concentración y no por que el microorganismo contenido en dicho depósito sea superproductor del metabolito en cuestión.

25 Por regla general, las tecnologías existentes no permiten confinar eficazmente todos los tipos de microorganismos en duraciones superiores a 24h.

El objetivo del procedimiento según la invención es poder estudiar un ciclo de vida completo, sea cual sea el tipo de microorganismos, sus actividades biológicas y sus velocidades de crecimiento.

30 De manera más precisa, el procedimiento según la invención para el cultivo de microorganismos por confinamiento en micro-biorreactores es del tipo que comprende un tubo capilar en el que circula un fluido portador destinado a hacer avanzar un tren de gotas constituido por micro-biorreactores en los que tiene lugar el cultivo de dichos microorganismos, en el que dichos micro-biorreactores están separados por un fluido espaciador, siendo este último un gas.

Según un modo preferido de la invención, el diámetro de los micro-biorreactores en los que tiene lugar el cultivo de dichos microorganismos es inferior al de dicho tubo capilar.

40 Ventajosamente, el tamaño de la burbuja de dicho fluido espaciador está comprendido en un rango de dos a diez veces el diámetro de dicho tubo capilar.

El procedimiento según la presente invención se entenderá mejor a partir de la lectura de la descripción siguiente, realizada con respecto a las figuras dadas a título puramente indicativo, entre las cuales:

- 45
- la figura 1 representa, de manera esquemática, la constitución del tren de gotas según el estado de la técnica;
 - 50 - la figura 2 es una vista en sección longitudinal de un capilar en el interior del cual circula un tren de gotas según el estado de la técnica;
 - la figura 3 es una vista en sección longitudinal de un capilar en el interior del cual circula un tren de gotas según la invención; y
 - 55 - la figura 4 representa, de manera simplificada, el conjunto del dispositivo de realización del procedimiento según la invención.

60 Como se representa en la figura 1, el tren de gotas está constituido de manera habitual a partir de tres fases (I), (II) y (III), no miscibles entre sí, proviniendo cada fase de un depósito no representado en la presente memoria, unas válvulas (por ejemplo unas electroválvulas o unas válvulas neumáticas) no ilustradas, que permiten la liberación de las diferentes fases en sus tubos respectivos (1), (2) y (3) que convergen hacia una unión en cruz, en la que se forman dichas gotas y cuya ramificación (4) es el tubo capilar en el que circula el tren de gotas. La fase (I) constituye el fluido portador, la fase (II) constituye las gotas en las que se cultivan los microorganismos y la fase (III) constituye el fluido espaciador, tal como se precisará más adelante en la presente descripción. El tamaño y el espaciamiento entre las diferentes gotas dependen de la geometría de la unión y de la proporción de los caudales de inyección de las fases. Finalmente, la encapsulación de microorganismos en el interior de las

gotas de la fase (II) sigue la ley de Poisson.

5 La técnica anterior, en particular la solicitud de patente francesa nº 11/00659, enseña cómo se constituye el tren de gotas descrito anteriormente; la presente invención no se refiere a este procedimiento de obtención de este tren de gotas.

10 La figura 2 permite observar mejor una parte del tren de gotas tradicional constituido por gotas (5) que contienen la mezcla de reacción en la que se desarrollará el microorganismo, separadas las unas de las otras por unas gotas de fluido espaciador (6) que impide que las gotas (5) se fusionen entre sí; las gotas (5) y (6) son arrastradas por un fluido portador (7) en el interior de un tubo capilar (8), permitiendo dicho fluido portador (7) al mismo tiempo desplazar las gotas y lubricar el capilar (8), evitando la contaminación entre gotas (5) consecutivas. Se entiende por tubo capilar, un tubo cuyo diámetro interno es inferior a 2 mm.

15 Como se ha mencionado anteriormente, el tren de gotas está constituido por tres fases no miscibles. El fluido portador (I) es generalmente un aceite perfluorado ("teflón líquido") que no presenta ninguna toxicidad para el microorganismo contenido en el micro-biorreactor. Con el fin de asegurar la buena formación del tren y evitar cualquier problema de contaminación entre las gotas, el aceite portador tiene una afinidad por el capilar superior a las otras fases.

20 La segunda fase (II) acuosa contiene las células y el medio de cultivo.

Finalmente, la tercera fase (III) no se mezcla con las dos primeras; puede consistir en un líquido tal como un hidrocarburo o un aceite mineral.

25 Al haberse recordado el estado de la técnica que se refiere a la formación de un tren de gotas que permite el cultivo de microorganismos en estas gotas, la presente descripción abordará ahora las mejoras aportadas a los procedimientos conocidos, superando así los inconvenientes de dichos procedimientos.

30 A continuación en la presente descripción, las gotas (5) en las que se cultivan los microorganismos se denominarán micro-biorreactores (5).

El procedimiento según la presente invención es aplicable a diferentes microorganismos, y en particular a los hongos filamentosos y a las algas planctónicas.

35 Los hongos filamentosos forman unos filamentos hidrófobos (hifas) que pueden extenderse de un micro-biorreactor a otro a través del líquido portador. En el caso en el que se utilice un líquido espaciador compuesto por un hidrocarburo, los filamentos podrán atravesar completamente hasta el micro-biorreactor cercano. Pueden así formar unas biopelículas en la interfaz micro-biorreactor/hidrocarburo, que obstruirán poco a poco totalmente la sección del capilar. Este fenómeno lleva a la destrucción del tren y a la interrupción del experimento.

40 Con el fin de resolver este problema, se ha descubierto, y es una de las características del procedimiento según la invención, que era posible utilizar como fluido espaciador un gas. Sin embargo, si el micro-biorreactor es demasiado grande y tiene una superficie de contacto importante con el capilar, también se puede producir el fenómeno de obstrucción debido al desarrollo del hongo filamentosos. Así, se plantean unos problemas de contaminación entre los micro-biorreactores (5), así como de estabilidad del tren de gotas debido a las interacciones de los filamentos con el capilar (8).

45 En el caso de las algas planctónicas, se ha observado en los bordes del tren de gotas un fenómeno de auto-emulsificación en los micro-biorreactores acuosos (5) así como en las burbujas espaciadoras (6). Esto significa que se forman espontáneamente unas gotitas de una fase a la otra en los dos tipos de compartimientos. La explicación más probable es la presencia de bacterias que cohabitan con las algas en los micro-biorreactores. Estas bacterias son capaces de sintetizar unos tensioactivos que favorecerán la auto-emulsificación y provocarán así el colapso del tren de gotas.

55 Tratándose de algas planctónicas, la utilización de un gas como fluido espaciador es suficiente para resolver el problema de auto-emulsificación.

60 Sin embargo, en el caso de los hongos filamentosos, esta sustitución no es suficiente para asegurar la estabilidad del tren. La solución consiste entonces, y es otra característica del procedimiento según la invención, en reducir el tamaño del micro-biorreactor (5) con el fin de disminuir las interacciones de los filamentos con las paredes del tubo capilar (8).

65 Entre los diferentes gases que sirven de fluido espaciador, se utilizará ventajosamente el aire, por un lado debido a sus propiedades de humectación y, por otro lado, por que se aproxima en estas condiciones a la fermentación en medio sólido.

Según una variante de realización, se utilizará una mezcla nitrógeno/dióxido de carbono como fluido espaciador; este fluido será particularmente ventajoso cuando los microorganismos a cultivar sean algas, ya que esta mezcla favorecerá la actividad de fotosíntesis.

5 Sea cual sea el fluido espaciador utilizado, que podrá presentarse en forma de una mezcla de gas, dicho fluido espaciador deberá:

- ser no miscible con el fluido portador y el contenido de los micro-biorreactores,

10 - no interactuar con el microorganismo, es decir que el microorganismo no debe ser capaz de crecer o propagarse en el fluido espaciador,

- no ser tóxico, es decir perjudicial para el crecimiento del microorganismo.

15 Según un modo preferido de realización del procedimiento según la invención, el diámetro de los micro-biorreactores (5) será inferior al del tubo capilar (8); a título aún más preferido, el diámetro de los micro-biorreactores (5) estará en un intervalo comprendido entre el 80% y el 85% del diámetro del tubo capilar (8). Una configuración de este tipo será particularmente ventajosa cuando los microorganismos a cultivar en los micro-biorreactores (5) sean unos hongos filamentosos. Por debajo del valor del 80%, existe un riesgo de ver a las burbujas de aire sucesivas, que constituyen el fluido espaciador (6), entrar en contacto por debajo de los micro-biorreactores (5), lo cual provoca rápidamente las fusiones de burbujas espaciadoras (6) y de los micro-biorreactores (5).

25 El tren de gotas utilizado para el crecimiento de los hongos filamentosos estará constituido ventajosamente según el modo de realización siguiente.

30 Las esporas de hongos filamentosos están suspendidas en medio PGS (glucosa 10 g/l, peptona pancreática 6 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0,5 g/l, KH₂PO₄ 0,5 g/l, FeSO₄ 7H₂O 0,5 mg/l, pH ajustado a 5). El líquido portador está compuesto por aceite fluorado Novec 7500 (HFE). El tren se fabrica a nivel de una unión en cruz de diámetro interior de 0,5 mm conectado a un tubo capilar en FEP de 15 m de largo y de diámetro interior 0,75 mm. El medio PGS y el aceite HFE se inyectan mediante unas bombas de jeringa con unos caudales respectivos de 5,0 y 3,5 ml/h. El aire es inyectado por medio de una válvula solenoide con una presión de 0,5 bar a través de un tubo de 50 cm de largo y de diámetro interior de 0,2 mm. Este tubo permite crear una resistencia hidrodinámica suficiente para generar un tren homogéneo. En cada borde del tren, se inyectan unas burbujas de aire de 10 cm de largo y permiten confinar el tren.

40 Además, se ha observado, en el caso de crecimiento de algas y de hongos filamentosos, que las burbujas de aire espaciadoras (6) disminuían a lo largo del tiempo debido a la actividad biológica en el interior de los micro-biorreactores (5) (respiración y fotosíntesis). Como resultado, si las burbujas espaciadoras (6) son demasiado pequeñas al principio de la realización del procedimiento según la invención, llega un momento en el que algunas desaparecen, provocando la coalescencia de los micro-biorreactores (5) que separaban. Ventajosamente, para obtener un tren estable sobre más de 90 h, el tamaño de una burbuja espaciadora (6) deber ser por lo menos diez veces más grande que el diámetro interno de un tubo capilar (8).

45 Al ser largas las cinéticas estudiadas, se han podido observar unos efectos de bordes. Se obtiene así una disminución del tamaño de los micro-biorreactores (5) en los dos bordes del tren, que puede dar como resultado la coalescencia del micro-biorreactor (5) con su vecino. Este efecto está relacionado también con el hecho de que se utiliza aire como fluido espaciador, que favorecerá la evaporación. Para superar este fenómeno, un modo preferido de realización del procedimiento según la invención consiste en saturar con agua los depósitos de fluido portador, permitiendo la recirculación del tren.

50 Se dará ahora un ejemplo de realización del procedimiento según la invención.

55 1/ Preparación de las soluciones:

- suspensión de microorganismos en el medio de cultivo a una concentración que corresponde al porcentaje de ocupación deseado (número de células/-micro-biorreactores)

- aceite perfluorado saturado con agua adicionado con tensioactivo perfluorado (0,06%)

60 2/ Generación del tren de gotas con:

- fluido portador: aceite perfluorado HFE7500 + un 0,06% de tensioactivo

- fluido espaciador: aire comprimido

65 - reactivos: suspensiones de microorganismos

La proporción caudales/presiones de los tres fluidos se ajusta para obtener:

- a) un tamaño de micro-biorreactor (5) comprendido entre el 80 y el 85% del diámetro interno del tubo (8),
- b) un tamaño de burbuja espaciadora (6) de por lo menos tres veces el diámetro interno del tubo (8).

Las características de tamaño que figuran en a) y en b) anteriores aparecen en la figura 3.

3/ Adición de tapones terminales de fluido espaciador en forma de una burbuja larga (6) al principio y al final del tren de gotas.

4/ Control de la calidad del tren de gotas (80% < tamaño de los micro-biorreactores < 85%), por análisis de imagen.

5/ Seguimiento cinético por movimiento de ida y vuelta del tren de gotas delante del detector (9).

6/ Análisis de los datos registrados para cada micro-biorreactor.

A título indicativo, la tabla siguiente recoge diferentes parámetros (fluido espaciador, tamaño de los micro-biorreactores o de las burbujas del fluido espaciador) y permite ver cuál es la duración de incubación máxima de los microorganismos en función de estos parámetros.

Nº del ensayo	Tamaño del micro-biorreactor (en % del diámetro interno del tubo capilar)	Fluido espaciador	Tamaño de las gotas o burbujas del fluido espaciador (en % del diámetro interno del tubo)	Duración de la incubación máxima
1	100%	Aceite mineral	200%	48h
2	100%	Aceite mineral	200%	34h
3	100%	Aceite mineral	200%	28h
4	100%	PDMS(100cSt)	200%	13h
5	100%	PDMS(50cSt)	200%	20h
6	100%	Escualeno	200%	25h
7	100%	Aire	1000%	22h
8	95%	Aire	1000%	30h
9	85%	Aire	1000%	91h
10	85%	Aire	600%	60h
11	90%	Aire	1200 %	68h
12	90%	Aire	1200%	162h
13	90%	Aire	1500%	109h

En la tabla anterior, se han cultivado los microorganismos siguientes:

- *Aspergillus Oryzae* (hongo filamentoso) para los ensayos 1-7 y 11;
- *Aspergillus Niger* (hongo filamentoso) para los ensayos 8-10;
- *Chlamydomonas Reinhardtii* (alga unicelular) para los ensayos 12-13.

Al tratarse de los hongos filamentosos antes citados, los mejores resultados en términos de estabilidad se han obtenido en los ensayos 9, 10 y 11.

Gracias a las mejoras aportadas en el ámbito del procedimiento según la invención, se ha podido demostrar que era posible seguir unas cinéticas de crecimiento y de actividades biológicas en micro-biorreactores en duraciones por el momento inaccesibles para el experto en la técnica.

A pesar de que las algas y las levaduras no atraviesan la barrera aceite portador/medio de cultivo durante su crecimiento, este método de confinamiento da como resultado una estabilidad incrementada del tren de gotas, reduciendo la interacción entre la gota de medio de cultivo y las paredes del tubo, sabiendo que la disminución de la tensión de superficie relacionada con los metabolitos segregados por los microorganismos durante su crecimiento afecta a la estabilidad del tren a lo largo del tiempo. Finalmente, la utilización de las burbujas de gas puede permitir regular los intercambios gaseosos sirviendo de depósito de oxígeno (respiración de los hongos filamentosos) o de dióxido de carbono (fotosíntesis de las algas).

Los micro-biorreactores (5) están dispuestos en un tren unidimensional que puede variar de varios centenares a varios miles de muestras. Cada micro-biorreactor (5) se identifica por su rango en el tren. La integridad del tren de micro-biorreactores es así esencial para asegurar unas reacciones durante largos periodos. Los micro-biorreactores (5) se ponen en movimiento continuamente con el fin de preservar la película de lubricación y provocar por recirculación una homogeneización del micro-biorreactor. Haciendo pasar el tren delante de un

detector (9), tal como se ilustra en la figura 3, en un sentido y después en el otro, es posible seguir a lo largo del tiempo las reacciones dentro de cada micro-biorreactor (5). Es posible asimismo hacer pasar el tren de micro-biorreactores (5) delante del detector siempre en el mismo sentido, asegurando un bucle de recirculación, permitiendo seguir a lo largo del tiempo las reacciones dentro de cada micro-biorreactor.

5

Este detector (9) está integrado en un módulo de incubación (10) que comprende en particular una bomba (11) y unas válvulas (12) (electroválvulas o válvulas neumáticas, por ejemplo) que permiten hacer circular en un sentido y después en el otro el tren de micro-biorreactores, siendo este último cargado en la sección A y después desplazado delante del detector (9) hacia la sección B. La presencia de salidas (13) permite eliminar los micro-biorreactores (5) indeseables y limpiar el circuito una vez terminado el experimento. Un módulo (14) completa el presente sistema, módulo en el que está constituido el tren de gotas (micro-biorreactores y burbujas de fluido) de acuerdo con la figura 1 con los diferentes depósitos que contienen la fase (I), (II) y (III).

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el cultivo de microorganismos por confinamiento en micro-biorreactores (5), del tipo que comprende un fluido portador destinado a hacer avanzar en un tubo capilar (8) un tren de gotas constituido por micro-biorreactores (5) en los que tiene lugar el cultivo de microorganismos susceptibles de modificar las interfaces de dichas gotas, en el que dichos micro-biorreactores (5) están separados por un fluido espaciador, caracterizado por que dicho fluido espaciador es un gas.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho gas es el aire.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho gas es una mezcla de nitrógeno y de dióxido de carbono.
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el diámetro de dichos micro-biorreactores (5) es inferior al de dicho tubo capilar (8).
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho diámetro de dichos micro-biorreactores (5) está comprendido entre el 80% y el 85% del diámetro de dicho tubo capilar (8).
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicho fluido espaciador se presenta en forma de una burbuja (6) cuyo tamaño está comprendido en un rango de dos a diez veces el diámetro de dicho tubo capilar (8).
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicho fluido portador procede de un depósito saturado con agua.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el microorganismo cultivado es un hongo filamentoso.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que dicho hongo filamentoso es *Aspergillus Oryzae* o *Aspergillus Niger*.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el microorganismo cultivado es un alga planctónica.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que dicha alga es *Chlamydomonas Reinhardtii*.

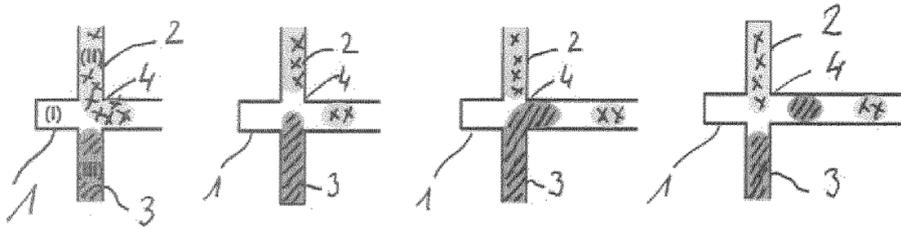


Figura 1

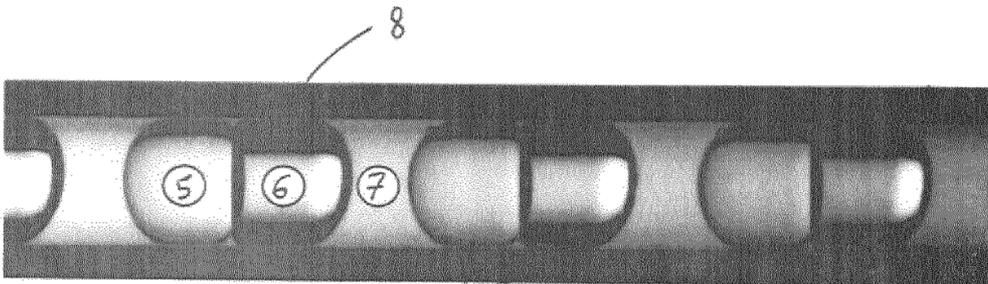


Figura 2

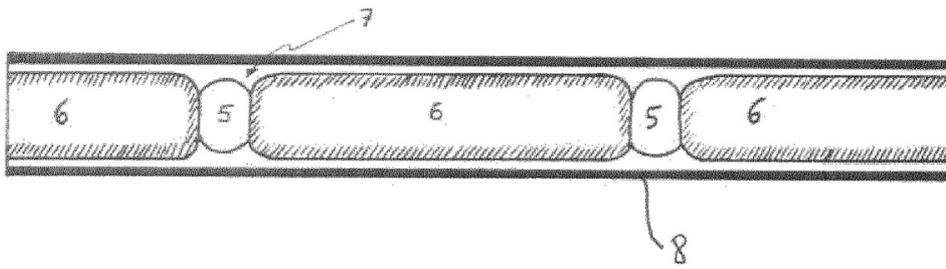


Figura 3

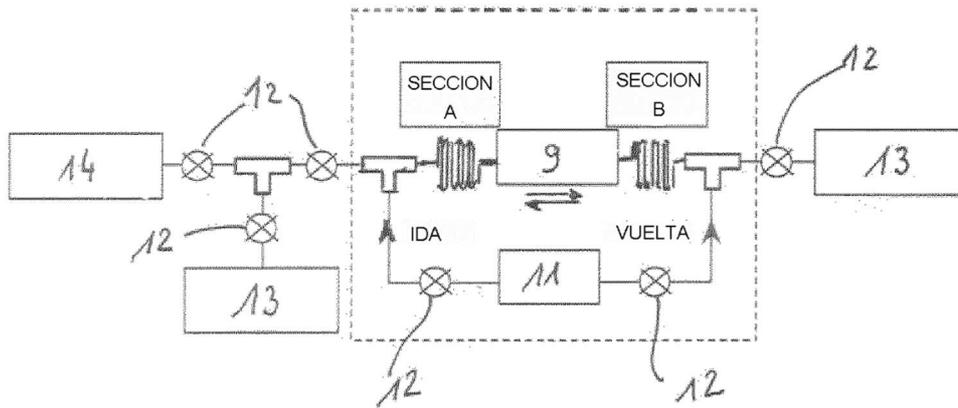


Figura 4