

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 748 343**

(51) Int. Cl.:

C12P 17/16 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
D06M 16/00 (2006.01)
D06P 5/15 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2016 PCT/GB2016/000098**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16162657**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2016 E 16723798 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3280811**

(54) Título: **Procedimiento de teñido de tejidos con microorganismos**

(30) Prioridad:

09.04.2015 GB 201506018

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

16.03.2020

(73) Titular/es:

**COLORIFIX LIMITED (100.0%)
Innovation Centre, Norwich Research Park,
Colney Lane
Norwich NR4 7GJ, GB**

(72) Inventor/es:

**NUGENT, DAVID GLEN HASTIE;
YARKONI, ORR y
AJIOKA, JAMES**

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 748 343 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

Procedimiento de teñido de tejidos con microorganismos

5 [0001] Esta invención guarda relación con un procedimiento para teñir un substrato, como telas, hilos y fibras que utilizan microorganismos por el cual la adsorción de microorganismos con tintes en fibras textiles se está mejorado mediante fuentes de carbono superiores a un umbral de concentración. Las moléculas de tinte contenidas en el microorganismo son liberadas por el microorganismo y fijadas directa y localmente a las fibras textiles a través de una etapa de tratamiento térmico. Dicho tratamiento térmico también desactiva los microorganismos portadores. Las 10 especies de microorganismos simples o múltiples, y tintes simples o múltiples producidos por dichas especies de microorganismos simples o múltiples pueden crear una gran variedad de colores textiles. También pueden añadirse tintes sintéticos adecuados antes, durante o después de que los microorganismos hayan producido tintes, pero antes de la etapa de tratamiento térmico liberadora de tintes.

15 Producción de tinte

[0002] La mayoría de los tintes contemporáneos para telas se sintetizan químicamente y necesitan precursores y solventes tóxicos. Se estima que, en términos industriales, se utilizan más de 10 000 tintes y pigmentos diferentes y que se producen más de 700 000 toneladas de tintes sintéticos al año en todo el mundo (Chequer et al., 2013, *Eco-friendly textile dyeing and finishing*, pp. 151-176).

[0003] La producción microbiana de pigmentos ha sido objeto de estudio durante cientos de años. En el caso de los pigmentos como la prodigiosina y el violaceína, los microbios naturales se han cultivado específicamente para producir pigmentos (JP10113169; JP55019070A; JP55148091; JP63245666A).

25 [0004] La patente estadounidense n.º 4.520.103 de Ensley describe un procedimiento para la producción de índigo con una bacteria recombinante en un medio sin indol. El uso de cepas específicas de una *E. coli* recombinante para producir índigo o indigotina a partir de indol se describe particularmente a través de un gen que codifica una dioxigenasa aromática de otra bacteria para convertir el indol.

30 [0005] La preparación de indol se describe en la patente estadounidense n.º 5.112.747 de Van Grinsven et al., Hart et al (*Microbiology* 138 211-216 (1992) donde se describe una *E. coli* recombinante que contenía un gen clonado de *Rhodococcus* para producir índigo e indirubina. Se produce indol que se oxida a índigo.

35 [0006] La patente estadounidense 5.077.201 de Eyal et al. describe una nueva cepa mutante de hongo Morel que se ha descubierto que produce el pigmento azul índigo por fermentación sumergida en un medio de cultivo de nutrientes que contiene un sustrato de carbono y nitrógeno.

40 [0007] JP06257074 (1994) y JP06341069 (1994) mencionan procesos que implican la inmersión de productos textiles en un medio de cultivo.

[0008] EP 252 002 (1988) hace referencia a la biomasa que contiene índigo, que se utiliza para teñir sin aislar el tinte de índigo.

45 [0009] Se han evaluado numerosas fuentes de carbono para la pigmentación del microorganismo, incluyendo glicerol, maltosa, sacarosa, citrato, lactosa y glucosa (*World Journal of Microbiology & Biotechnology* (2005) 21): 969-972). Como se abordó en otra parte de este documento, las fuentes de carbono como el glicerol actúan como agentes antibacterianos en concentraciones que exceden el 10 % (v/v). En consecuencia, estos compuestos se utilizan como fuentes de carbono durante la producción de pigmentos de microorganismos a una concentración suave, por lo 50 general, <5 % (v/v), más comúnmente 1 % (v/v).

Extracción de tinte

[0010] Una vez que el microbio ha producido los pigmentos que actúan como tintes, los procedimientos de extracción incluyen el uso de solventes orgánicos como cloroformo, éter, acetato de etilo, ácido sulfúrico acuoso, acetona, hexano, benceno, etanol o metanol (Patente 5.077.201; Patente estadounidense 5.691.171; Rettori y Duran, 1998, *World J. Microbiol. Biotechnología* 14: 685-688; JP10113169; JP63245666 A), o hirviendo el microbio en una solución acuosa (JP2810287B2; JP10113169). La extracción con solventes produce desechos químicos que son difíciles y caros de reciclar o desechar, además de ser altamente nocivos para la vida acuática si se vierten en vías 60 fluviales.

[0011] Las etapas de extracción de pigmentos secundarios pueden incluir reducción de volumen, cambio de solvente, o sonicación o congelación (patente estadounidense n.º 5.834.297; Patente estadounidense 5.691.171).

65 Pretratamiento de tejidos

[0012] La patente estadounidense n.^o 6.436.696 revela el tratamiento de las fibras textiles con enzimas en ausencia de tensioactivos con el efecto de aumentar la humectabilidad y la absorbencia de las fibras. Las enzimas son pectinásas, celulásas, proteásas, lipásas o combinaciones de ellas. Las propiedades humectantes de las fibras de algodón mejoran sustancialmente con el tratamiento con una mezcla de celulasa y pectinasa. Como se indica en la patente estadounidense 6.436.696, dichas enzimas pueden ser producidas por microorganismos como hongos y bacterias. Los microorganismos que producen lipásas adecuadas incluyen *Candida ancudensis*, *Candida Antártica*, *Candida atmospherica*, *Candida bombi*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* y muchos otros.

[0013] En el proceso de teñido de tintes producidos microbiológicamente se han utilizado conocidos pretratamientos de tejidos. Estos últimos incluyen: 1) jabón estándar, carbonato de sodio anhídrico, monohidrato de monohidrocloruro de L-histidina, NaCl y NaHPO₄ para el abultamiento de tejidos y la eliminación de impurezas; y 2) mordientes como alúmina, sulfato de cobre, sulfato ferroso, silicato de sodio, cal apagada y preparación de tamarindo (Chequer et al., 2013, Eco-amigable textile dyeing and finishing, pp. 151-176).

Deposición de tinte

[0014] Desde la década de 1940, tanto el glicerol como los alquílicos derivados del glicerol se utilizaban en numerosos procedimientos de teñido y estampado para textiles (*Usos del glicerol*, elaborado por la Asociación de Productores de glicerol). La glicerina en sí misma produce pastas colorantes de excelente funcionalidad, promueve la fijación de los tintes en las pastas de estampación, incrementa el valor del color en la estampación y ayuda a contener la humedad con el paso del tiempo.

[0015] El glicerol es un ingrediente de muchos tintes que se utiliza en forma de pasta, evitando de este modo que los tintes se sequen y se peguen a los lados del tambor. En esta aplicación se aconseja su grado de anticorrosión y bajo punto de congelación. Durante el teñido, la miscibilidad en agua del glicerol presente en la pasta de tinte y su acción disolvente en muchos tipos de tintes ayuda a dispersar este último en el baño de tinte, donde el alto punto de ebullición del glicerol se convierte en otra de sus ventajas. En ocasiones se añade glicerina directamente al baño de tinte, como fue el caso de las fórmulas de teñido de nailon desarrolladas por el Comité de Tareas de Nailon durante la Segunda Guerra Mundial para cumplir con los requisitos de resistencia al lavado y otros requisitos del Cuerpo de Intendencia de los Estados Unidos. En el teñido con naftol, a veces se utiliza glicerol antes del acoplamiento para mejorar la estabilidad de la solución de naftol.

[0016] En términos generales, la concentración de glicerol utilizada en mezclas de tintes y pastas colorantes se limita a minimizar el tiempo necesario para secar las telas después del teñido y reducir las dificultades de marcado, respectivamente (*Technicus Rayon Textile Mo. 24; 65; 1943*). En un caso se utilizó la siguiente mezcla para teñir los tonos azules: 1,7 kg de indantreno azul resistente al cloro; 39,0 litros de hidróxido de sodio; 6,4 kg de hiposulfato; y 0,5 kg de glicerol (*Textile Research Journal March 1944 vol. 14 No. 3 69-73*). En este caso, la concentración de glicerol fue del 1,1 % (v/v).

[0017] Según Bennett, H., «Chemical Formulary,» Vol. VI, Nueva York, Chem. Publishing Co. pp. 518-9, 1943, un tinte típico de estampación textil contiene: 20 gramos de color directo; 310 gramos de agua caliente; 50 gramos de glicerol; 20 gramos de fosfato de sodio; 500 gramos de espesantes a base de almidón; 100 gramos de ovoalbúmina. Las pastas de impresión ácidas contemporáneas prescritas en línea por la Universidad Robert Gordon contienen 0,1-3 gramos de tinte ácido, 5 gramos de glicerol, 20 ml de agua tibia, 60 gramos de Manutex RS, 2 gramos de oxalato de amonio y 5 ml de agua caliente. Así, puede observarse que la concentración recomendada de glicerol contenida en los tintes para estampación de tejidos se ha mantenido en el 5 % (v/v) durante más de 70 años.

[0018] Otros procedimientos de teñido en los que se aplica el glicerol son el teñido en cubeta de tejidos de acetato, el teñido de algodones con colores directos y la preparación de compuestos de teñido para utilizarlos en lana, seda, algodón, fibras sintéticas y, en particular, fibras de rayón y fibras discontinuas hechas de celulosa. Los procesos de teñido con pistola utilizan glicerol como solvente, dispersante y agente de suspensión para tintes o pigmentos. Las características no espumosas de las composiciones resultantes promueven un teñido uniforme. También se puede utilizar para producir tintes mezclados de efectos «umbray». Además de esto, puede aplicarse en teñido de lecho fluido, tintes dispersos de acetato y tintes azoicos.

[0019] El glicerol también se ha utilizado como un agente acondicionador de textiles con amplio uso en el sector de la lubricación, encolado y suavizado de hilados o telas. Su eficacia en estas y otras aplicaciones similares se debe principalmente a su viscosidad e hidroscopidad, propiedades que contribuyen a la acción plastificante. Las cualidades hidroscópicas, o humectantes, también tienen en cuenta la utilización de glicerol en tratamientos especiales, como los procesos para aumentar la capacidad de uso de las telas o para evitar cargas estáticas en las fibras. Debido a la impermeabilidad al gas venenoso, en particular al «mostaza», el glicerol se ha aplicado en acabados resistentes a los gases. La solubilidad en agua también es una gran ventaja cuando el glicerol actúa como lubricante. Esto evita la necesidad de utilizar agentes abrasivos fuertes que tienden a dañar el tejido pero que a menudo deben

utilizarse para eliminar otros aceites lubricantes.

[0020] Como aditivo a las composiciones lubricantes, tamaños o acabados varios, el glicerol actúa como plastificante, disolvente y penetrante. Evita que la fibra se seque y se pegue, elimina el polvo de dimensiones y puede 5 ayudar a dispersar los aceites lubricantes insolubles en agua que se aplican con un baño de agua.

[0021] El glicerol también se incluye en formulaciones de tintas de impresión acuosas y a base de disolventes. En este caso, esta sustancia actúa como humectante para inhibir la evaporación del fluido portador mientras controla la viscosidad de la tinta y, por lo tanto, la dinámica del fluido durante el proceso de deposición. Los procesos de 10 deposición de tinta pueden incluir la impresión por chorro de tinta, serigrafía, tampografía, etc. Por lo general, la concentración de glicerol más otros humectantes en la formulación de la tinta es < 20 % (v/v) (*Digital Imaging: Water-based Inks and HSE, Photo Marketing Association International*, 2004). Como se explica en la patente estadounidense 3.846.141 *Composición de la tinta de impresión por chorro*, no se pueden utilizar concentraciones más altas de glicerol u otros humectantes en la impresión por chorro porque el compuesto de la tinta se vuelve demasiado viscoso y, en 15 consecuencia, se inhibe su paso a través de los chorros.

[0022] La solicitud de patente de la OMPI WO/2006/019672 describe la inclusión del glicerol en una formulación de tinta erradicable. En ese caso, el glicerol está presente en una cantidad mayor que el contenido de agua, que es relativamente bajo, y el tinte erradicable se suministra en cantidades sustanciales de modo que el glicerol y el tinte 20 erradicable proporcionen la viscosidad necesaria para la tinta de un bolígrafo. Ahora, el agua está presente en una cantidad que oscila aproximadamente de 10 al 20 % (v/v) y el glicerol está presente en una cantidad aproximada del 30 al 50 % (v/v).

[0023] En todas las circunstancias mencionadas anteriormente, el glicerol se utiliza para cambiar las 25 propiedades físicas, sobre todo la viscosidad y la higroscopia, del fluido portador acuoso o a base de disolvente, pero no del tinte en sí, como el tinte azoico o el pigmento. Más específicamente, el glicerol no tiene interacciones significativas, intencionadas o deliberadas con el tinte de manera directa independientemente de la presencia o ausencia de un fluido portador.

[0024] La patente estadounidense 5.872.002 describe un procedimiento de estampado textil que utiliza 30 microorganismos para decolorar tejidos previamente teñidos con un tinte azoico (que también puede contener un tinte no azoico). Esta técnica se basa en la capacidad de cepas bacterianas como *Xanthomonas* NR25-2 para metabolizar tintes azoicos que comprenden varios isómeros. Las regiones de cepas bacterianas depositadas en un tejido se desactivan preservando así la coloración azoica mediante elementos calefactores de diseño, o pastas ácidas de 35 diseño, o pastas alcalinas de diseño o desinfectantes de diseño. En particular, estas cepas bacterianas no producen ni depositan pigmentos, sino que eliminan los tintes azoicos mediante el metabolismo parcial o total de un tinte azoico previamente depositado.

[0025] Los tintes producidos microbiológicamente extraídos en solución pueden depositarse directamente en 40 el tejido mediante un procedimiento convencional (JP10113169; JP2810287B2). En el caso de la violaceína y la prodigiosina, se ha demostrado que funciona en numerosos tipos de tejido (Yusof et al., 2012, *Application of bacterial pigments as colorant: the Malaysian perspective*).

[0026] El glicerol ha registrado en numerosos casos como una fuente de carbono para la producción de 45 microbios (*Biotechnology Advances* 27 (2009) 30-39). Por lo general, la concentración de glicerol en los medios de comunicación M9 es del 2 % (v/v). Las concentraciones más elevadas de glicerol tienden a inhibir el crecimiento microbiano. De hecho, el glicerol ha sido estudiado como agente antibacteriano para la conservación a largo plazo de aloinjertos cutáneos (Burns, Volumen 34, Número 2, 2, 205 - 211).

50 Fijación del tinte

[0027] En el caso de los tintes extraídos y producidos microbiológicamente, se ha demostrado que la mordiente (consulte Pretratamiento de tejidos) mejora la transferencia de tintes que produce tejidos de color más oscuro (Chequer et al., 2013, *Ecofriendly textile dyeing and finishing*, pp. 151-176; Yusof et al., 2012, *Application of bacterial pigments as colorant: the Malaysian perspective*). Algunos procedimientos incluyen la adición de mordientes posteriores al teñido, como las sales metálicas. El tratamiento térmico para la fijación del tinte se utiliza comúnmente, con procedimientos que incluyen el calentamiento en solución a temperaturas superiores a 80 °C (JP1011316169; Chequer et al., 2013, *Eco-friendly textile dyeing and finishing*, pp. 151-176).

[0028] La patente estadounidense 2.297.230 describe el uso de glicerol como aditivo durante un proceso de 60 tratamiento de vapor en textiles. En este caso, el glicerol sirve para reforzar la unión del aceite rojo de Turquía, un detergente sintético, en el tejido durante el tratamiento al vapor. Asimismo, la patente estadounidense 2.297.230 especifica que el glicerol debe dispensarse junto con formalina (formaldehído en agua) para prevenir en gran medida la formación de moho y esporas. Por lo tanto, la patente estadounidense 2.297.230 no es relevante para el presente 65 procedimiento porque: a) no hace referencia a la tintura textil; b) emplea vapor y no agua líquida; e c) incluye una

sustancia que sería altamente nociva para el proceso microbiológico especificado en el presente documento.

Gestión de residuos

5 [0029] Todas estas etapas requieren una gestión de residuos y un ahorro de agua, ya que muchos tintes, sus precursores y los disolventes utilizados para producirlos y extraerlos son peligrosos para la salud humana y el medio ambiente. La industria textil consume una gran cantidad de agua en sus procesos de fabricación debido principalmente al proceso de teñido. Las aguas residuales de las plantas textiles están clasificadas como las más contaminantes de todos los procesos industriales (Chequer et al., 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, pp. 151-176).

10

[0030] En el proceso de teñido, entre el 10 y el 50 % del tinte se pierde como residuo y termina en los vertidos (Chequer et al., 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, pp. 151-176). A escala mundial, esto produce la liberación anual de 2x105 toneladas de tinte en el medio ambiente (Chequer et al., 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, pp. 151-176). De media, la relación entre la masa de agua y la masa de tejido requerida es de hasta 15 100:1 (*Huntsman Textile Effects*, Singapur).

20 [0031] En conclusión, los procedimientos existentes para producir tintes para telas y transferir y fijar dichos tintes a telas, hilos y textiles requieren la producción y uso de químicos tóxicos y la generación de desechos tóxicos. Además, el consumo de agua durante los procesos de teñido y el posterior tratamiento de las aguas residuales imponen cargas significativas a la demanda local de agua. Aunque las ventajas del glicerol como aditivo de tinte y agente de tratamiento de tejidos son ampliamente reconocidas, las concentraciones de esta sustancia se limitan a niveles bajos (normalmente inferiores al 5 % (v/v)). Aunque se ha debatido la producción microbiológica de tintes para telas, tales procedimientos no se extienden a los procedimientos mejorados para extraer, depositar y fijar dichos tintes en los hilos de las telas.

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

30 [0032] La invención está definida según las reivindicaciones. De este modo, la invención proporciona un procedimiento para teñir un substrato, el procedimiento que comprende las etapas de:

35

- a. cultivo de un microorganismo productor de tinte en presencia de un sustrato que se vaya a teñir y en presencia de un medio de cultivo que contenga una fuente de carbono a una concentración umbral predeterminada en el intervalo del 10 % (v/v) al 90 % (v/v), de modo que el microorganismo se cultive en contacto con el sustrato;
- b. lisado del microorganismo cultivado para liberar el tinte en contacto con el sustrato; y
- c. fijación del tinte liberado en el sustrato.

40 [0033] El umbral de concentración de la fuente de carbono predeterminado anteriormente depende de la fuente de carbono seleccionada para optimizar la tasa de transferencia de los microorganismos que contienen el tinte al sustrato y la calidad de la subsiguiente fijación del tinte al sustrato.

45

[0034] En una realización: a) las fases de lisado y fijación se llevan a cabo en un solo proceso; o b) en las que las fases de lisado y fijación se llevan a cabo exponiendo el sustrato y los microorganismos al calor por encima de los 100 °C; opcionalmente, en las que el calor se selecciona a partir del calor directo o indirecto; opcionalmente, en las que el calor directo consiste en la exposición del sustrato y de los microorganismos en un receptáculo adecuado a la llama, una placa calefactora o un calentador eléctrico; o en las que el calor indirecto consiste en el calentamiento del sustrato y de los microorganismos en un autoclave o en una microonda.

50 [0035] En una realización se seleccionan uno o más parámetros de cultivo escogidos a partir de la temperatura, la concentración de dióxido de carbono, el pH y la frecuencia de agitación para optimizar la producción del tinte, la tasa de transferencia al sustrato y la calidad de la fijación al sustrato.

55

[0036] En una realización, el procedimiento comprende además la etapa de: a) cultivar el microorganismo productor del tinte en ausencia del sustrato que se vaya a teñir, antes de la etapa 1a; o b) el lavado del sustrato teñido para eliminar los contaminantes residuales antes y después de la etapa 1c.

55

[0037] En una realización se utilizan simultáneamente dos o más especies diferentes de microorganismos productores de tinte; opcionalmente, cuando uno o más microorganismos diferentes producen dos o más tintes diferentes.

60 [0038] En una realización, durante las etapas de lisado y fijación, se encuentran presentes tintes adicionales, incluidos los añadidos exógenamente.

[0039] En una realización, el sustrato se selecciona entre sustratos naturales, sintéticos, semisintéticos y mixtos; opcionalmente, entre los que se puede elegir: a) el sustrato natural se selecciona a partir de seda, algodón, lino, lana y cuero; b) el sustrato semisintético se selecciona a partir de rayón y acetato; o c) el sustrato sintético se

selecciona a partir de poliéster, nílon, acrílico, elastina, polivinilo y derivados petroquímicos similares.

[0040] En una realización: a) los microorganismos productores de tintes producen un tinte seleccionado a partir de pigmentos derivados biológicamente, cromoproteínas, proteínas fluorescentes y proteínas bioluminiscentes; o b) los microorganismos están modificados genéticamente.

[0041] En una realización: (A) los microorganismos son organismos eucariotas; opcionalmente, en los que los organismos eucariotas se seleccionan a partir de plantas, algas, hongos, gusanos y artrópodos; o (B) los microorganismos son organismos procarióticos; opcionalmente, en los que: a) los organismos procarióticos se seleccionan a partir de la arqueología y las eubacterias; b) los organismos procarióticos son bacterias Gram positivas seleccionadas a partir de *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp.; o c) los organismos procarióticos son bacterias Gram negativas seleccionadas a partir de *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Chromobacterium* spp. y *Janthinobacter* spp.

[0042] En una realización, la etapa de cultivo tiene lugar: (a) en un ambiente de crecimiento seleccionado de incubadoras, incubadoras por agitación, fermentadores y biofermentadores; o (b) a una temperatura entre 1 °C y 150 °C; o (c) una concentración de dióxido de carbono entre el 0 % y el 10 %; o (d) un pH entre 1,5 y 9,5.

[0043] En una realización, el medio de crecimiento se selecciona entre el caldo Luria-Bertani (LB), el caldo terrílico (TB), el caldo superóptimo (SOB), el caldo superóptimo con represión de catabolita (SOC) y la dextrosa de peptona de extracto de levadura (YPD).

[0044] En una realización: a) la fuente de carbono se selecciona a partir de dextrosa, glucosa, sacarosa, fécula de patata, citrato, lactosa, maltosa, glicerina, xantosa y arabinosa; opcionalmente, cuando la fuente de carbono es glicerina; o b) la fuente de carbono está presente en una gama de concentraciones de preferiblemente del 15 % (v/v) al 60 % (v/v), y más preferiblemente del 20 % (v/v) al 40 % (v/v).

[0045] En una realización, se selecciona el umbral de concentración de la fuente de carbono para promover la distorsión de la forma del microorganismo durante el crecimiento.

[0046] En una realización, la invención proporciona un procedimiento para teñir un sustrato según las reivindicaciones 1 a 3 utilizando el tinte contenido en un tinte que produce microorganismo.

[0047] Es posible alcanzar este proceso si se observan las siguientes condiciones al teñir sustratos (como tejidos) utilizando directamente microorganismos que actúan como agentes para el pretratamiento del sustrato, así como para la producción, deposición y fijación del tinte.

[0048] Para la producción de tinte, pueden utilizarse en este proceso tanto microorganismos naturales (no recombinantes) capaces de producir tanto pigmentos intermedios como finales, así como microorganismos recombinantes que hayan sido modificados para poder producir pigmentos intermedios o finales.

[0049] El pretratamiento (incluida la modificación de cualquier tipo de sustrato) se realiza mediante la acción de procesos metabólicos llevados a cabo por microorganismos que penetran en el sustrato y por las composiciones del medio que facilitan estos procesos. El pretratamiento permite una penetración/permeación/fijación más efectiva del tinte en el sustrato. La deposición del tinte se logra mediante la producción localizada y la liberación del tinte por parte del microorganismo que ha penetrado en el sustrato. El aumento de las concentraciones locales conduce a una mayor absorción del tinte, y la reducción sustancial de grandes cantidades de tinte libre en la solución conduce a una cantidad sustancialmente reducida de producto de desecho. En la etapa de fijación del tinte, la gran mayoría del tinte presente en el microorganismo inactivado se transfiere al sustrato debido al lisado.

[0050] La fijación del tinte se consigue mediante la exposición del sustrato tratado a temperaturas superiores a 121 °C. Esto tiene el doble propósito de inactivar todos los microorganismos presentes en el sustrato, así como la fijación del tinte al sustrato. La máquina de autoclaves automática industrial, fabricada por Sparrow Tex Engineering Works y Bluemoon Machines Manufacturing Company, puede utilizarse en la fijación de calor y el acondicionamiento de hilados en varios rangos de capacidad.

[0051] La etapa final de lavado elimina la gran parte de los microorganismos inactivados y los detritos relacionados con los microorganismos del sustrato. El sustrato final ha sido esterilizado y limpiado según un estándar que se acerca a los requisitos de los dispositivos médicos.

[0052] La ventaja es que los procedimientos descritos superan los procedimientos convencionales de producción, transferencia y fijación de tinte en cuanto a generación de residuos, consumo de agua y energía. Los residuos generados mediante el proceso descrito no incluyen ninguno de los siguientes: disolventes orgánicos, productos ácidos o alcalinos concentrados, como la lejía. La manipulación, inactivación y eliminación de los residuos derivados de este proceso resulta segura y económica en comparación con los procedimientos convencionales. Todos

los residuos generados en este proceso son compuestos biodegradables. Algunos de los productos de desecho generados por este proceso pueden tener valor comercial como, por ejemplo, el fertilizante para plantas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

5 [0053] Las características y las ventajas de esta invención las comprenderán mejor aquellos que lean la siguiente descripción detallada. Además, las referencias en singular también pueden incluir el plural (por ejemplo, «una» pueden referirse a uno, o a uno o más), a menos que el contexto especifique lo contrario.

10 [0054] El uso de valores numéricos en los distintos rangos especificados en esta solicitud, a menos que se indique expresamente lo contrario, se indican como aproximaciones como si los valores mínimos y máximos dentro de los rangos indicados estuvieran precedidos por la palabra «alrededor de». De este modo, se pueden emplear pequeñas variaciones por encima y por debajo de los rangos indicados para lograr substancialmente los mismos resultados que los valores dentro de los rangos. Además, la divulgación de estos rangos pretende ser un rango
15 continuo que incluya todos los valores entre los valores mínimos y máximos.

[0055] Este proceso tiene como objetivo combinar el pretratamiento del sustrato y la producción, deposición y fijación localizada de sustratos (como las telas). Los tejidos pueden ser naturales (algodón, seda, lana y otros de naturaleza similar) o sintéticos (poliéster, rayón, elastina y otros de naturaleza similar) en su composición.

20 [0056] La producción de tinte se logra mediante el uso de un microorganismo capaz de producir pigmentos con las propiedades deseadas en un tinte. En este proceso se pueden utilizar tanto microorganismos naturales (no recombinantes) capaces de producir pigmentos intermedios y de punto final como microorganismos recombinantes que hayan sido modificados para poder producir pigmentos intermedios o de punto final. Los ejemplos incluyen pero
25 no se limitan a: *Serratia* spp, *Janthinobacter* spp, *Chromobacterium* spp, *Bacillus* spp, *Escherichia* spp, *Cyanobacterium* spp, *Pseudomonas* spp. Como ejemplo, un derivado K12 de *E. coli* modificada para producir grandes cantidades de violaceína mediante la introducción de un plásmido que lleva un operón de violaceína reacondicionado. La refactorización incluye una reorganización del orden de las secuencias de codificación enzimática, la adición de sitios de unión de ribosomas delante de cada secuencia de codificación y la optimización de codones de las secuencias
30 de codificación para su expresión en *E. coli*.

[0057] Prácticamente, cualquier microorganismo que pueda ser modificado genéticamente puede ser incorporado a este proceso. Una etapa importante en este proceso consiste en la aplicación directa del microorganismo al sustrato para facilitar la coloración localizada del sustrato.

35 [0058] El pretratamiento (incluida la modificación de cualquier tipo de sustrato) se realiza mediante la acción de procesos metabólicos llevados a cabo por microorganismos que penetran en el sustrato y por las composiciones del medio que facilitan estos procesos. El pretratamiento permite una penetración, permeación y fijación más efectiva del tinte en el sustrato.

40 [0059] La etapa de pretratamiento la realiza el microorganismo en una amplia gama de condiciones que impulsan el metabolismo del microorganismo a través de varios parámetros, tales como el contenido de nutrientes, el pH y la salinidad. La naturaleza del microorganismo empleado en este proceso determinará la composición óptima del medio. Por ejemplo, el *Chromobacterium violaceum* requiere un entorno óptimo muy diferente al de *Escherichia coli*.

45 [0060] Como ejemplo de realización de esta invención, un K12 derivado de *E. coli* modificada para producir cantidades altas de violaceína se utilizó para pretratar los siguientes sustratos: seda, lana, rayón, poliéster, elastano, algodón y lino. Las composiciones del medio utilizadas para el pretratamiento del sustrato con la cepa de *E. coli* mencionada anteriormente incluyen los siguientes componentes básicos: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, 50 fuente de aminoácidos, fuente de sal metálica y agua.

Explicación

55 [0061] Sin querer ser limitados por la teoría, creemos que la mejor absorción de los microorganismos que contienen tinte en el tejido textil viene causada por los cambios en la morfología de estos microorganismos cuando se exponen a una fuente de carbono si esta fuente de carbono está más allá de un límite de concentración. Más específicamente, más allá de una determinada concentración de la fuente de carbono, los microorganismos se vuelven significativamente más largos y distorsionados en lo que respecta a su forma. Los microorganismos más largos son más propensos a enredarse en los hilos de la tela, mientras que las contorsiones a lo largo de su longitud hacen que 60 sean más difíciles de desprenderse de su anclaje entre las fibras. El umbral de concentración preciso dependerá de numerosos factores, como la especie del microorganismo, la fuente de carbono utilizada y las condiciones de funcionamiento, como la temperatura y el nivel de pH. En términos generales, hemos encontrado que la concentración umbral está en el rango del 10 % (v/v) al 60 % (v/v), más comúnmente del 20 % (v/v) al 40 % (v/v).

Figuras

[0062]

- La figura 1 muestra un procedimiento para el cultivo y depósito de pigmentos producidos por microorganismos según 5 JP2810287 B2 (1998). La figura 1A muestra una primera etapa en la que se inocula una sola especie de bacterias productoras de pigmento (1) en una solución media (2). La figura 1B muestra una segunda etapa en la que las bacterias se inoculan en una segunda solución de medio (3) durante 18 horas a 30 °C. La figura 1C muestra una tercera etapa en la que se añade un producto de descomposición de la lana (4) a la solución del medio y se agita durante cinco días a 30 °C. La figura 1D muestra una cuarta etapa en la que se añaden hilos (5) a la solución del medio, mientras que 10 algunos de los pigmentos contenidos en los microorganismos se liberan en la solución del medio (6) hirviendo la solución del medio a 100 °C durante 20 minutos. La figura 1E muestra una sexta etapa en la que las roscas se retiran del baño de tinte después de hervirlas y lavarlas con agua corriente para eliminar la solución de medios residuales y los pigmentos sueltos. Una cantidad no especificada de pigmentos deberá permanecer en la solución media (7) y adherida al producto de descomposición de la lana (8).
- 15 La figura 2 muestra el procedimiento para teñir textiles según esta invención. Antes de la primera etapa de teñido, los microorganismos productores de tinte (10) se preparan según los procedimientos microbiológicos estándar. Estos procedimientos pueden incluir técnicas como la biología sintética y la ingeniería genética. Se inocula una sola colonia del microorganismo en solución media según los procedimientos estándar.
- 20 En una primera fase de teñido, el microorganismo productor de tinte (10) se inocula en un volumen de solución de medio (11) y se deja que se desarrolle durante la noche según las técnicas microbiológicas estándar. El medio de cultivo resultante que contiene altas concentraciones de microorganismos con tinte (12) se complementa con un volumen de solución de medio (13) y un segundo volumen de fuente de carbono (14). La concentración resultante de la fuente de carbono debe estar en el rango del 10 % (v/v) al 90 % (v/v), preferiblemente del 15 % (v/v) al 60 % (v/v), 25 más preferiblemente del 20 % (v/v) al 40 % (v/v). Se añade un sustrato (15), es decir, tejido o hilo, al cultivo y se incuba durante la noche según procedimientos estándar.
- Después de la incubación nocturna, la gran mayoría de los microorganismos que contienen tinte se adsorberán en el sustrato (16), incluyendo los espacios entre las fibras cercanas. En consecuencia, los medios de cultivo y la solución fuente de carbono (17) deberán estar sustancialmente desprovistos de microorganismos.
- 30 En una segunda etapa de teñido, el sustrato teñido (18) se retira del medio de cultivo y se lava en un baño de agua (19) para eliminar las fuentes de carbono residual y los detritos de microorganismos del sustrato. El agua de lavado residual, que puede contener cantidades residuales de microorganismos libres, puede reutilizarse en lotes de teñido posteriores o esterilizarse en una lejía suave o autoclave de vapor. El sustrato teñido se somete a un tratamiento térmico como el planchado en seco (no se muestra) o el autoclave a vapor (20) o el microondas (no se muestra). En 35 todos los casos, la temperatura aplicada debe ser superior a 100 °C, preferiblemente 121 °C. Esta segunda etapa de teñido desempeña la doble función de (a) liberar el tinte de los microorganismos directamente sobre los sustratos en los que los microorganismos se han adsorbido a través del lisado, y (b) fijar la liberación del tinte con el lisado sobre el sustrato. La fijación del tinte y la esterilización de las aguas residuales de lavado pueden realizarse en el mismo ciclo de autoclave.
- 40 Una lavadora (21) que funciona con ajustes estándar (por ejemplo, un lavado a 40 °C con detergente biológico) elimina los microorganismos lisados (22) del sustrato (23) con moléculas de tinte (24) fijadas a sus fibras. El sustrato lavado se seca con procedimientos estándar (no mostrados).
- La figura 3 muestra el crecimiento de un microorganismo en un cultivo líquido, aquí *E. coli*, en una concentración de 45 glicerol del 1 % (v/v) en un medio LB al 50 % (v/v) y agua. *E. coli* se cultivó durante 24 horas en 50 % (v/v) LB mediano (10 g NaCl, 5 g de Extracto de Levadura, 1 g de Peptona, 1 L de agua) y el 1 % (v/v) de glicerol. El microorganismo ha crecido con éxito y la longitud media medida de las bacterias es de aproximadamente 3,5 micras.
- La figura 4 y la figura 5 muestran el crecimiento de un microorganismo en un cultivo líquido, aquí *E. coli*, en una 50 concentración de glicerol del 5 % (v/v) en un medio LB al 50 % (v/v) y agua. *E. coli* se cultivó durante 24 horas en 50 % (v/v) LB medio (10g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona, 1 L de agua) y 5 % (v/v) de glicerol. Los microorganismos han crecido con éxito, aunque no tanto como la concentración del 1 % (v/v). La longitud media de las bacterias medida está en el rango de 4 a 5 micras.
- 55 La figura 6 muestra el crecimiento de un microorganismo en un cultivo líquido, aquí *E. coli*, en una concentración de glicerol del 10 % (v/v) en un medio LB al 50 % (v/v) y agua. *E. coli* se cultivó durante 24 horas en 50 % (v/v) LB medio (10g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona, 1 L de agua) y 10 % (v/v) de glicerol. El crecimiento de microorganismos es sustancialmente menor que en el caso del 1 % (v/v). La longitud media medida del microorganismo es de 11 micras. Los microorganismos se han curvado a lo largo de su longitud.
- 60 La figura 7 y la figura 8 muestran el crecimiento de un microorganismo en un cultivo líquido, aquí *E. coli*, en una concentración de glicerol del 20 % (v/v) en un medio LB al 50 % (v/v) y agua. *E. coli* se cultivó durante 24 horas en 50 % (v/v) LB mediano (10 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona, 1 L de agua) y 20 % (v/v) de glicerol. El crecimiento de los microorganismos es sustancialmente inferior en el caso del 1 % (v/v). La longitud medida de las 65 bacterias está en el rango de 15 a 20 micras. Los microorganismos se han curvado sustancialmente a lo largo de su

longitud.

La figura 9 a la figura 11 muestran el crecimiento de un microorganismo en un cultivo líquido, aquí *E. coli*, en una concentración del 50 % (v/v) de glicerol en un medio LB del 50 % (v/v) y agua. *E. coli* se cultivó durante 24 horas en 5 50 % (v/v) LB mediano (10 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona, 1 L de agua) y 50 % (v/v) de glicerol... El crecimiento de los microorganismos es sustancialmente inferior al caso del 1 % (v/v). La longitud medida de las bacterias está en el rango de 10 a 15 micras. Los microorganismos se han deformado sustancialmente a lo largo de su longitud.

10 Aditivos para medios de comunicación utilizables:

[0063] Las composiciones medias implicaban la adición de sales, de las cuales se incluyen, pero no se limitan a ellas: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, aislados o combinados. Las composiciones medias implicaban la adición de una fuente de aminoácidos, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a: Triptona, peptona, 15 bactopeptona, caseína y aminoácidos, aislados o combinados. Las composiciones medias implicaban la adición de una fuente de carbono, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a: Extracto de levadura, sacarosa, glucosa, glicerol, fructosa, xilosa, lactosa, arabinosa, aislados o combinados. Las composiciones medias implicaban la adición de una fuente de nitrógeno, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a: extracto de levadura, triptona, peptona, bactopeptona, caseína y aminoácidos, aislados o combinados. Todos los aditivos del medio mencionados 20 anteriormente pueden emplearse con resultados variables en función del organismo utilizado para el proceso de pretratamiento.

Condiciones de crecimiento:

25 **[0064]** Las condiciones óptimas de crecimiento varían según el microorganismo empleado en el proceso de pretratamiento. Los parámetros que afectan en gran medida el resultado final incluyen pero no se limitan a: pH, salinidad y temperatura.

[0065] Como ejemplo, un derivado K12 de *E. coli* modificada para producir grandes cantidades de violaceína 30 se utilizó para tratar previamente los siguientes sustratos: seda, lana, rayón, poliéster, elastina y algodón. Se probaron diversas condiciones de crecimiento, con rangos de pH entre 5-9, rangos de salinidad del 0,1 % al 3 % y temperaturas de entre 20 °C y 42 °C. Los rangos óptimos para estos parámetros fueron: pH 5,8-8,2, salinidad del 0,5 %-1,5 % y temperatura: De 30 °C a 40 °C.

[0066] El pretratamiento facilita la interacción entre el recipiente que contiene el tinte (microorganismo) y el sustrato (tejido). Para lograr este efecto, el microorganismo empleado se cultiva en un medio adecuado (consulte la composición del medio más arriba) durante un período de 12 a 48 horas, dependiendo de la relación inoculante/inoculado, la composición del medio empleado y las condiciones de crecimiento utilizadas. Todo el cultivo se complementa con un medio adicional (consulte la composición del medio más arriba) y se añade el sustrato en este 40 punto. El pretratamiento tiene lugar en un marco de temporal similar al del período de crecimiento.

[0067] La deposición del tinte se logra mediante la producción localizada y la liberación del tinte por parte de los microorganismos que han permeado el sustrato. El aumento de las concentraciones locales produce una mayor absorción del tinte y la ausencia de grandes cantidades de tinte libre en la solución conduce a una cantidad 45 sustancialmente reducida de producto de desecho. Las tasas de deposición de tinte variarán dependiendo del pigmento que se esté produciendo así como del microorganismo que se esté empleando.

[0068] Estos parámetros variarán según la citotoxicidad del pigmento producido por el microorganismo, la solubilidad en agua del pigmento, la afinidad del pigmento con el sustrato y las condiciones de crecimiento empleadas 50 (consulte las condiciones de crecimiento anteriores).

[0069] Por ejemplo, un derivado K12 de *E. coli* modificada para producir grandes cantidades de violaceína se utilizó para depositar tintes en los siguientes sustratos: seda, lana, rayón, poliéster, elastina, algodón y lino. Se observó una penetración y asociación casi completa de la *E. coli* productora de violaceína/conteniendo *E. coli* con el sustrato 55 en las dos horas posteriores a la adición del sustrato al medio suplementado y continua durante todo el período de incubación del sustrato.

Etapa de acabado:

60 **[0070]** La etapa final de acabado se logra mediante la exposición del sustrato tratado a temperaturas superiores a 121 °C. Esto tiene el doble propósito de inactivar todos los microorganismos presentes en el sustrato, así como la fijación del tinte al sustrato.

[0071] La gran mayoría del tinte presente en el microorganismo inactivado se transfieren al sustrato debido al 65 lisado. La etapa final consiste en un lavado final que elimina la gran mayoría de los microorganismos inactivados y de

los compuestos relacionados con los microorganismos del sustrato. El sustrato final ha sido esterilizado y limpiado según una normativa que se acerca a los requisitos de los dispositivos médicos.

Productos de desecho:

5

[0072] El tinte no incorporado (residuos de tinte) está por debajo del estándar de la industria del 3 % y se ha alcanzado un nivel de incorporación mediante el proceso inventado que supera el 99,997 % de eficacia. Los medios gastados, como las sales disueltas, los aminoácidos y las fuentes de carbono, que quedan después del proceso de teñido, pueden reciclarse y reutilizarse para posteriores procesos de teñido utilizando el mismo tinte microbiológico o 10 uno diferente. Por lo tanto, a través de al menos dos vías (en primer lugar, un menor consumo de agua durante el proceso inicial de teñido y, en segundo lugar, la posibilidad de reutilizar las soluciones de medios gastadas sin tratamiento), el consumo de agua se reduce en los procedimientos descritos en comparación con los procedimientos convencionales.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para teñir un sustrato, el procedimiento comprende las etapas de:
 - 5 a. cultivo de un microorganismo productor de tinte en presencia de un sustrato que se vaya a teñir, y en presencia de un medio de cultivo que contenga una fuente de carbono a un límite de concentración predeterminado en el intervalo del 10 % (v/v) al 90 % (v/v), de modo que el microorganismo se cultive en contacto con el sustrato;
 - b. lisado del microorganismo cultivado para liberar el tinte en contacto con el sustrato; y
 - c. fijación del tinte liberado en el sustrato.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el límite de concentración predeterminado de la fuente de carbono depende de la fuente de carbono seleccionada para optimizar la tasa de transferencia de microorganismos que contienen tinte al sustrato, y la calidad de la subsiguiente fijación del tinte al sustrato.
- 15 3. Procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que:
 - (a) las etapas de lisado y fijación se llevan a cabo en un solo proceso; y/o
 - (b) en el que las etapas de lisado y fijación se llevan a cabo exponiendo el sustrato y los microorganismos al calor por encima de los 100 °C.
- 20 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que uno o más parámetros de cultivo seleccionados a partir de la temperatura, la concentración de dióxido de carbono, el pH y la frecuencia de agitación se seleccionan para optimizar la producción del tinte, la tasa de transferencia al sustrato y la calidad de la fijación al sustrato.
- 25 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además la etapa de:
 - (a) el cultivo inicial del microorganismo productor de tinte en ausencia del sustrato que se vaya a teñir, antes de la etapa 1a; y/o
- 30 30 (b) el lavado del sustrato teñido para eliminar los contaminantes residuales antes y después de la etapa 1c.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se utilizan simultáneamente dos o más especies diferentes de microorganismos productores de tinte.
- 35 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se presentan tintes adicionales, incluidos los tintes añadidos exógenamente, durante las etapas de lisado y fijación.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el sustrato se selecciona a partir:
- 40 (a) un sustrato natural seleccionado de seda, algodón, lino, lana y cuero;
- (b) un sustrato semisintético seleccionado a partir de rayón y acetato; o
- (c) un sustrato sintético seleccionado a partir de poliéster, nailon, acrílico, elastina, polivinilo y derivados petroquímicos similares.
- 45 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que:
 - (a) los microorganismos productores de tinte producen un tinte seleccionado a partir de pigmentos derivados biológicamente, cromoproteínas, proteínas fluorescentes y proteínas bioluminiscentes; y/o
- 50 50 (b) los microorganismos están modificados genéticamente.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que:
 - (A) los microorganismos son organismos eucariotas seleccionados a partir de algas y hongos; o
 - (B) los microorganismos son organismos procarióticos seleccionados de:
 - (a) la arqueología y las eubacterias;
 - (b) bacterias Gram positivas seleccionadas a partir de *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp.; o
 - (c) bacterias Gram negativas seleccionadas a partir de *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Chromobacterium* spp. y *Janthinobacter* spp.
- 60 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que tiene lugar la etapa de cultivo:
 - (a) en un entorno de crecimiento seleccionado a partir de incubadoras, incubadoras por agitación, fermentadores y biofermentadores; y/o

- (b) a una temperatura comprendida entre 1 °C y 150 °C; y/o
- (c) una concentración de dióxido de carbono entre el 0 % y el 10 %; y/o
- (d) un pH comprendido entre 1,5 y 9,5.

5 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se selecciona el medio de cultivo a partir de caldo Luria-Bertani (LB), caldo terrífico (TB), caldo superóptimo (medio SOB), caldo superóptimo con represión de catabolita (SOC), extracto de levadura dextrosa de peptona (YPD).

10 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se selecciona la fuente de carbono a partir de dextrosa, glucosa, sacarosa, fécula de patata, citrato, lactosa, maltosa, glicerol, xantosa y arabinosa.

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la fuente de carbono está presente en un rango de concentración de: 15 % (v/v) a 60 % (v/v);

15 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que utiliza un tinte contenido en un microorganismo productor de tinte.

20 16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que se selecciona el umbral de concentración de la fuente de carbono para promover la distorsión de la forma del microorganismo durante el crecimiento.

TÉCNICA ANTERIOR

Figura 1A

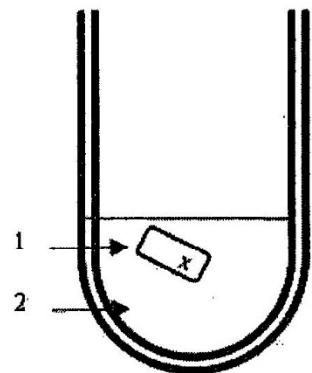


Figura 1B:

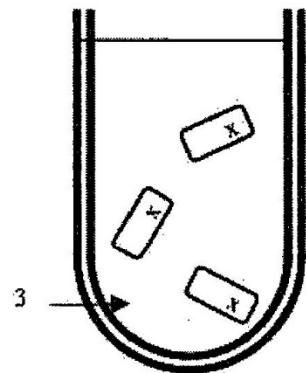


Figura 1C:

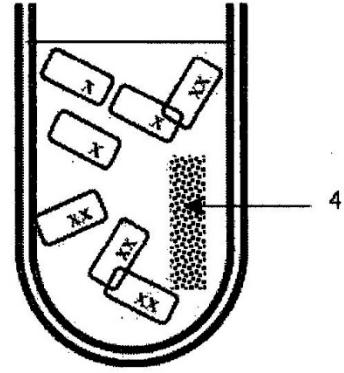


Figura 1D

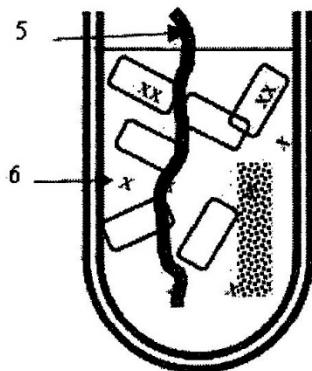


Figura 1E

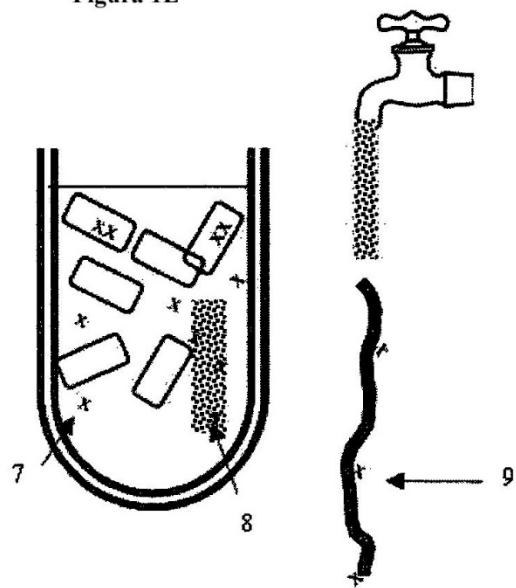


Figura 2A

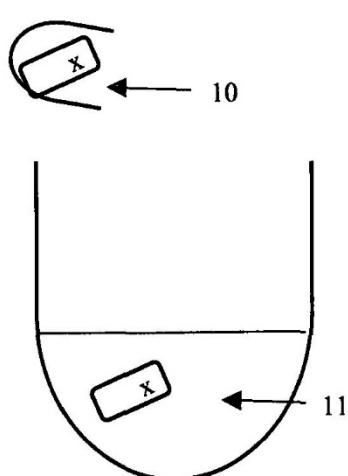


Figura 2B:

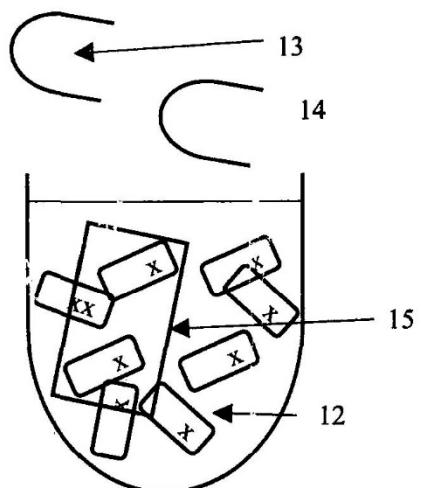


Figura 2C:

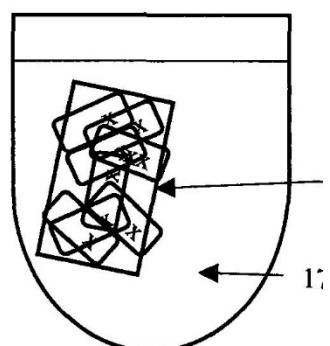


Figura 2D

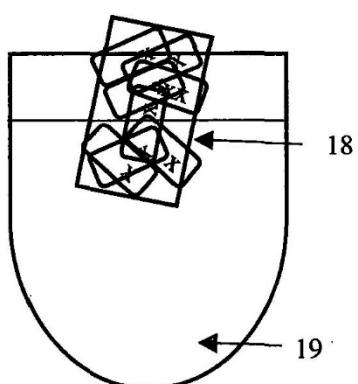


Figura 2E:

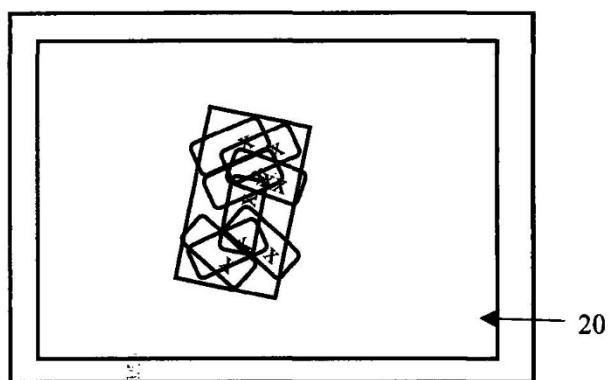


Figura 2F

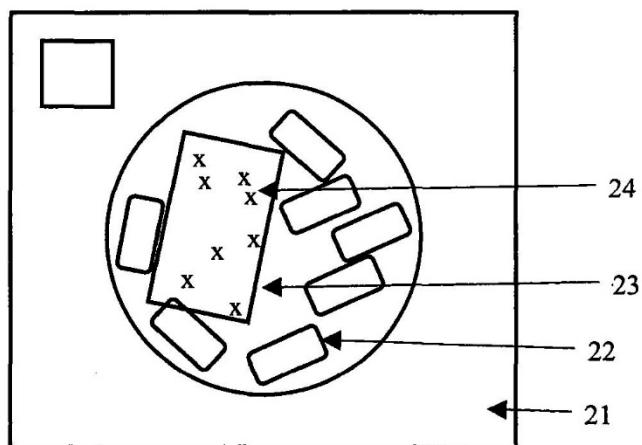
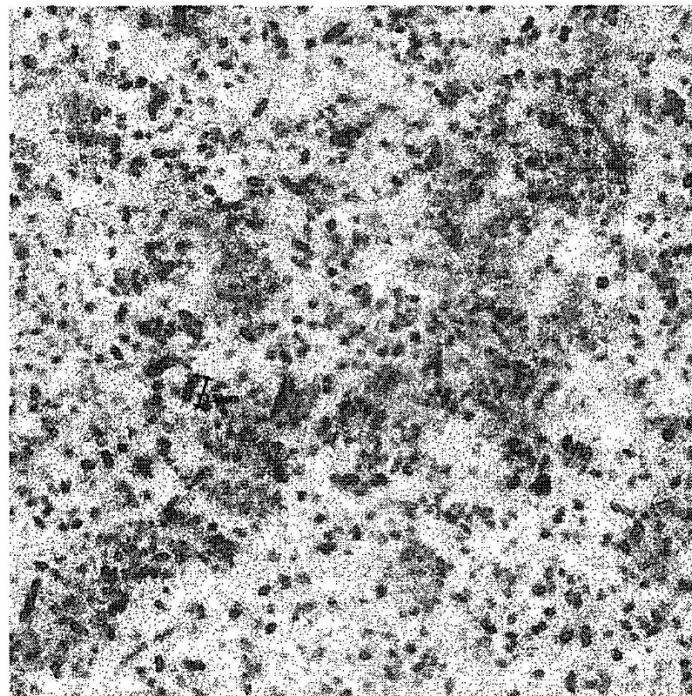


Figura 3

E. coli cultivado en 1 % de volumen de glicerol



10

Figura 4

E. coli cultivado en 5 % de volumen de glicerol

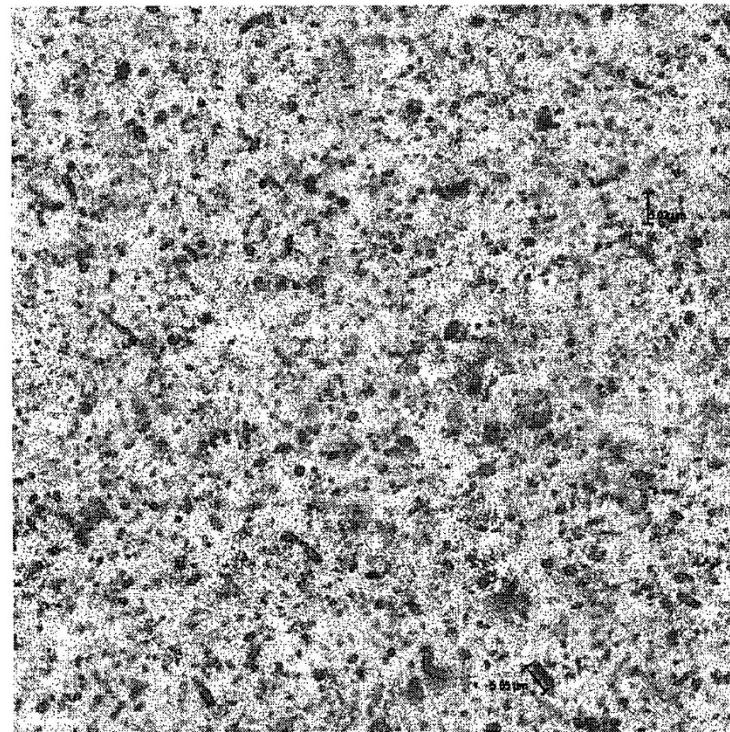


Figura 5

E. coli cultivado en 5 % de volumen de glicerol

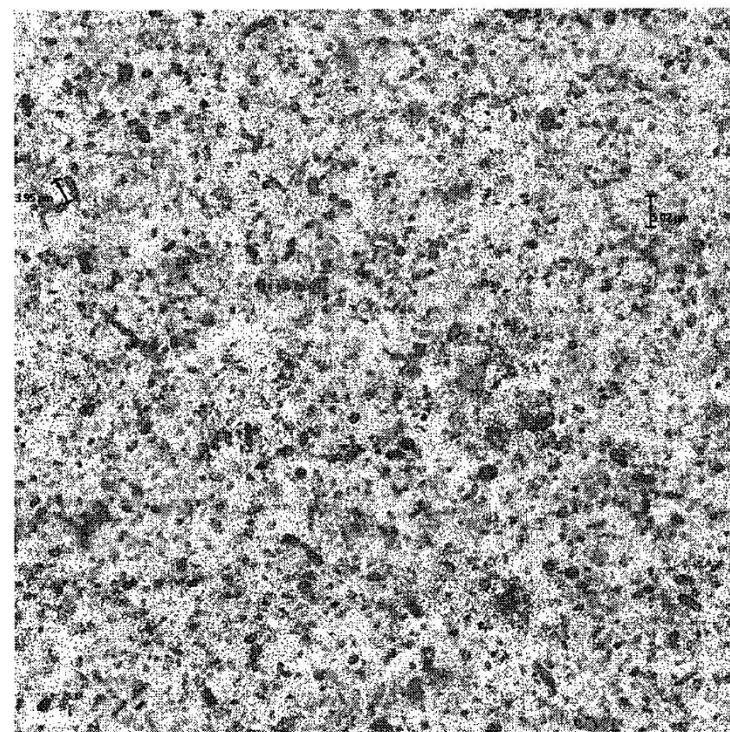
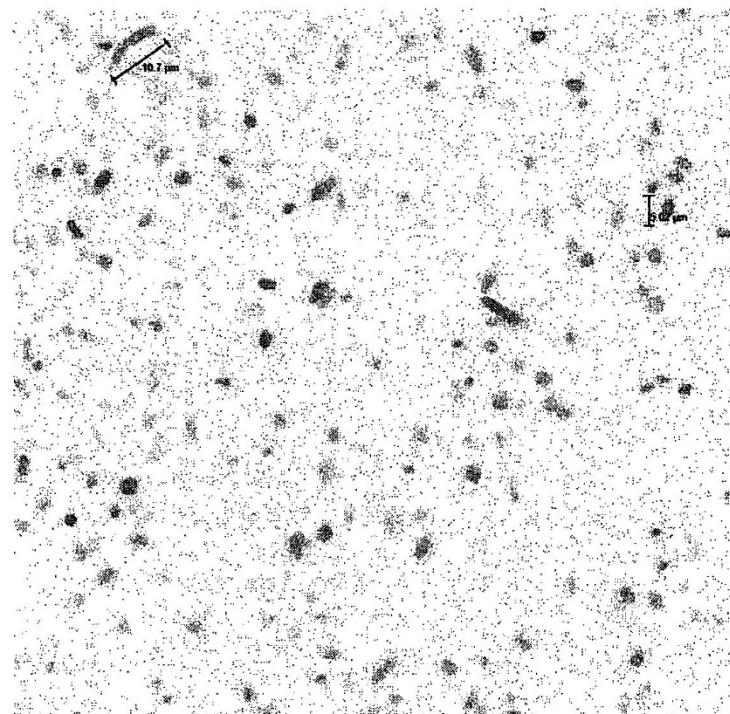


Figura 6

E. coli cultivado en 10 % de peso de glicerol



20

Figura 7

E. coli cultivado en 20 % de peso de glicerol

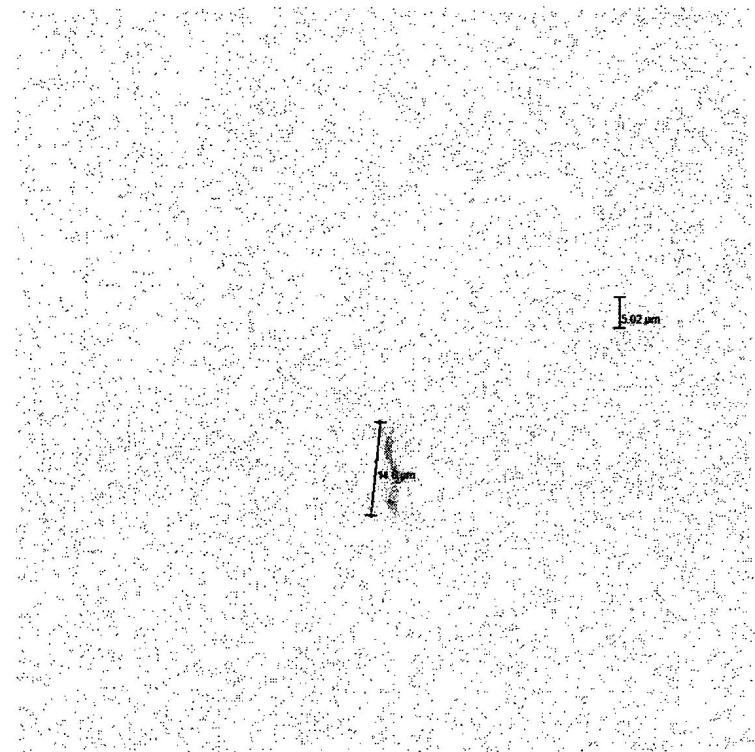


Figura 8

E. coli cultivado en 20 % de peso de glicerol

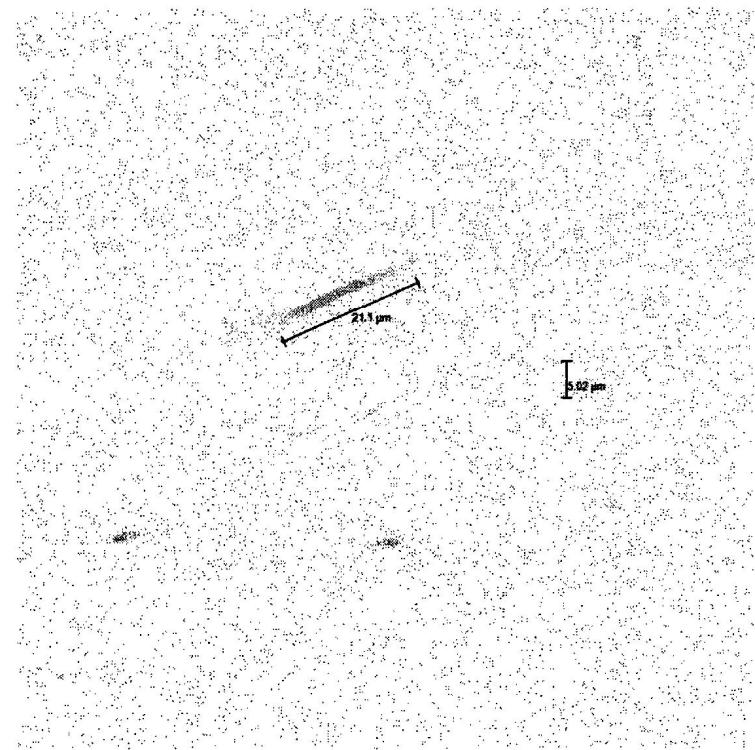


Figura 9

30 **E. coli cultivado en 50 % de peso de glicerol**

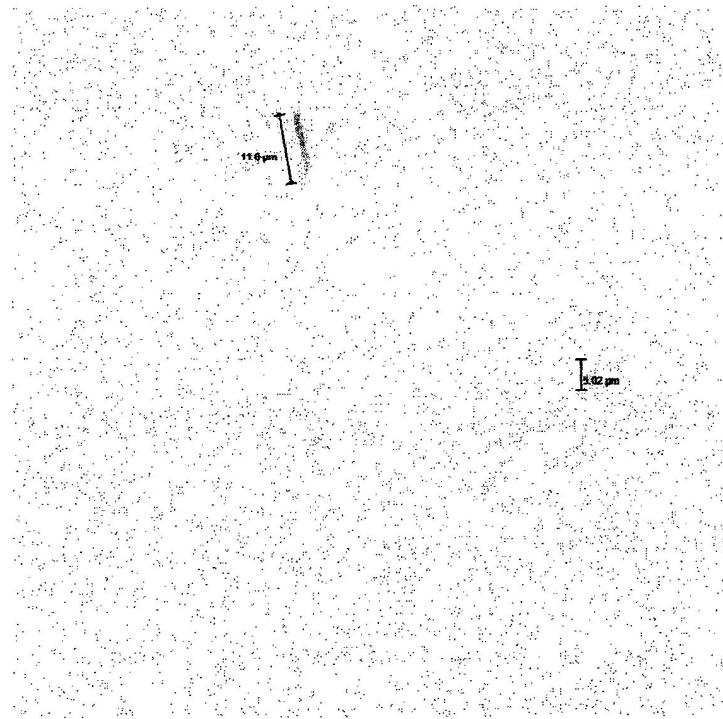


Figura 10

E. coli cultivado en 50 % de peso de glicerol

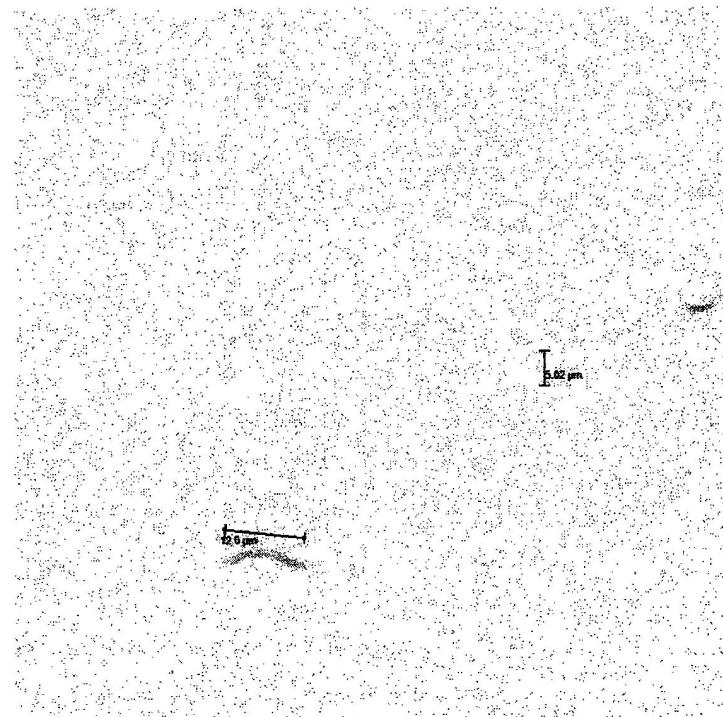
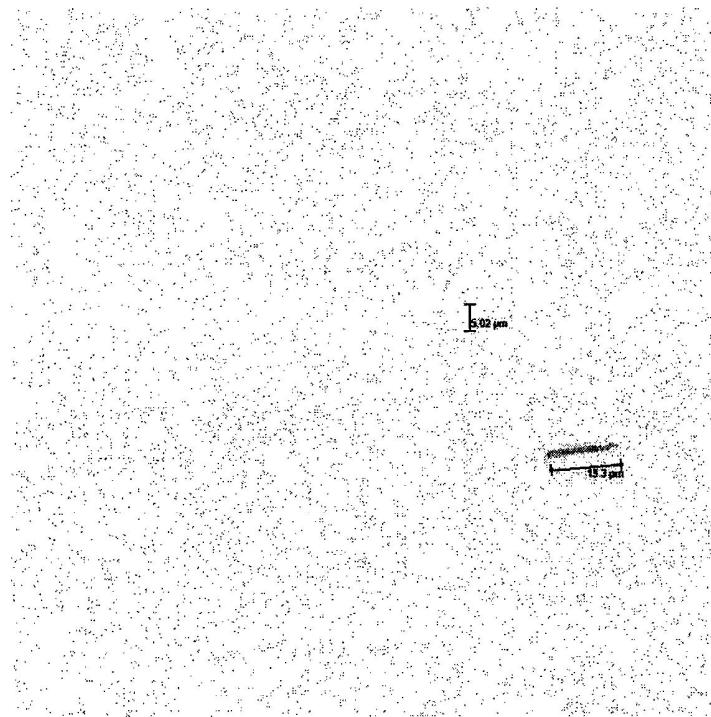


Figura 11

E. coli cultivado en 50 % de peso de glicerol



40