

DISPOSITIVO PORTÁTIL Y MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN EFICIENTE DE MICROBIOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América No. de serie 62/457,445, presentada el 10 de febrero de 2017, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad, incluidas las figuras, tablas y dibujos.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a dispositivos y métodos para producir composiciones basadas en microbios que pueden usarse, por ejemplo, en la industria petrolera, la agricultura, la acuicultura, la minería, el tratamiento de residuos y la biorremediación.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cultivo de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos es importante para la producción de una amplia variedad de biopreparaciones útiles. Los microorganismos desempeñan papeles cruciales en, por ejemplo, las industrias alimentarias, farmacéuticas, agrícolas, mineras, remediación ambiental y gestión de residuos.

20

Existe un enorme potencial para el uso de hongos en una amplia gama de industrias. El factor restrictivo en la comercialización de productos a base de hongos ha sido el costo por densidad de propágulos, donde es particularmente costoso e
5 inviable aplicar productos fúngicos a operaciones a gran escala en concentraciones suficientes para ver los beneficios.

Existen dos formas principales de cultivo de microorganismos: cultivo sumergido y cultivo de superficie. Las bacterias, las levaduras y los hongos se pueden cultivar
10 utilizando cualquiera de los métodos. Ambos métodos de cultivo requieren un medio nutriente para el crecimiento de los microorganismos. El medio nutriente, que puede estar en forma líquida o sólida, típicamente incluye una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales y nutrientes y microelementos
15 adicionales apropiados. Los niveles de pH y oxígeno se mantienen a valores adecuados para un microorganismo dado.

La agricultura y la industria petrolera son dos industrias en las que los microbios podrían desempeñar papeles altamente beneficiosos si pudieran estar disponibles más fácilmente y,
20 de preferencia, en una forma más activa.

A medida que el petróleo crudo fluye a través de un pozo, las sustancias en el petróleo crudo a menudo se acumulan en las superficies de las líneas de producción, causando una reducción en el flujo e incluso deteniendo la producción por

completo. Se utiliza una variedad de diferentes productos químicos y equipos para inhibir o prevenir y remediar este problema, pero existe la necesidad de mejores productos y métodos, especialmente métodos más amigables con el medio ambiente que hayan mejorado la efectividad y reducido la toxicidad.

Con el fin de aumentar los rendimientos y proteger los cultivos contra los patógenos, plagas y enfermedades, los agricultores se han basado en gran medida en el uso de productos químicos sintéticos y fertilizantes químicos; sin embargo, cuando se usan en exceso o se aplican de manera inadecuada, estas sustancias pueden escapar al agua superficial, filtrarse al agua subterránea y evaporarse en el aire. Incluso cuando se usa adecuadamente, la dependencia excesiva y el uso a largo plazo de ciertos fertilizantes químicos y pesticidas alteran de manera nociva el ecosistema del suelo, reducen la tolerancia al estrés, aumentan la resistencia a las plagas e impiden el crecimiento y la vitalidad de las plantas y los animales.

Si bien la eliminación total de productos químicos no es factible en este momento, los agricultores están adoptando cada vez más el uso de medidas biológicas como componentes viables de los programas de Manejo Integrado de Nutrientes y Manejo Integrado de Plagas. Por ejemplo, en los últimos años, el control biológico de los nematodos ha creado un gran interés.

Este método utiliza agentes biológicos como microbios vivos, bioproductos derivados de estos microbios y combinaciones de los mismos como pesticidas. Estos pesticidas biológicos tienen ventajas importantes sobre otros pesticidas convencionales.

5 Por ejemplo, son menos dañinos en comparación con los pesticidas químicos convencionales. Son más eficientes y específicos. A menudo se biodegradan rápidamente, lo que lleva a una menor contaminación ambiental.

El uso de biopesticidas y otros agentes biológicos ha sido muy
10 limitado por las dificultades en la producción, transporte, administración, fijación de precios y eficacia. Por ejemplo, muchos microbios son difíciles de cultivar y posteriormente se utilizan en sistemas agrícolas y de producción de petróleo en cantidades suficientes para ser útiles. Este problema se ve
15 exacerbado por pérdidas en la viabilidad y/o actividad debido al procesamiento; formulado; almacenamiento; estabilización antes de la distribución; esporulación de células vegetativas como medio de estabilización; transporte y aplicación.

Las composiciones basadas en microbios podrían ayudar a
20 satisfacer estas necesidades si hubiera métodos de cultivo más eficientes para la producción en masa de microorganismos y metabolitos microbianos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona dispositivos y métodos para producir composiciones basadas en microbios que pueden usarse en la industria del petróleo y el gas, la agricultura, la biorremediación, la acuicultura y muchas otras aplicaciones. Específicamente, la presente invención proporciona métodos y materiales para el cultivo eficiente de microorganismos y la producción de subproductos de crecimiento microbiano. La presente invención también proporciona dispositivos para dicho cultivo y producción.

Más específicamente, la presente invención proporciona un dispositivo de fermentación que puede usarse y transportarse a bajo costo sin requerir entrenamiento o habilidad especial. En realizaciones específicas, el dispositivo y los métodos se usan para cultivar inóculos de levadura y hongos, que luego se pueden usar en sistemas de fermentación más grandes. En ciertas realizaciones, el dispositivo y los métodos se usan para la producción de inóculos de levadura *Starmerella bombicola*.

En una realización, el dispositivo de la presente invención comprende un tambor giratorio soportado por una estructura, que puede tener ruedas. La rotación del tambor se logra usando un motor (por ejemplo, un motor eléctrico) conectado a una fuente de alimentación (por ejemplo, el dispositivo puede tener una batería o un cable de alimentación para conectarse a una

fuente de alimentación externa). El tambor también se puede conectar a un sistema de aireación, por ejemplo, un sistema de aireación que comprende una bomba de aire. Esto sirve para proporcionar aire a la superficie del cultivo dentro del tambor
5 y también puede servir como un medio para regular la temperatura interna.

Los deflectores se pueden unir a la superficie interna del tambor, para ayudar en la agitación y aireación del cultivo. Mientras el tambor gira, el cultivo se mezcla en él y se oxigena
10 con aire del medio ambiente y con el aire suministrado por el sistema de aireación.

En realizaciones preferidas, el dispositivo funciona continuamente durante todo el proceso de cultivo. El dispositivo puede funcionar durante el tiempo que sea necesario
15 para producir un volumen suficiente de cultivo, dependiendo de la especie particular de microorganismo que se produzca. Por ejemplo, el dispositivo de mezcla puede funcionar continuamente durante 1, 2, 3, 4, 5 o más días (o cualquier parte del mismo). Ventajosamente, el dispositivo puede autoesterilizarse
20 eficazmente. Por ejemplo, los microorganismos cultivados dentro del dispositivo de mezcla pueden ser cepas que producen metabolitos antimicrobianos o productos derivados, como los biosurfactantes. Por lo tanto, el cultivo de microbios en sí mismo puede proporcionar el control de microorganismos no

deseados dentro del tambor, simultáneamente con el cultivo de los microorganismos deseados.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona métodos de cultivo que simplifican la producción y facilitan la portabilidad de composiciones y productos útiles a base de microbios. Los métodos proporcionan el cultivo sumergido de composiciones de microbios adecuadas para inocular sistemas de fermentación a gran escala.

El inóculo producido por el dispositivo y método en cuestión puede usarse para inocular un sistema de fermentación presente en el sitio para la producción de grandes cantidades de composiciones basadas en microbios. En realizaciones preferidas, el dispositivo y los métodos en cuestión también se pueden usar en el sitio, de tal manera que el cultivo de inóculo se puede transferir directamente desde el dispositivo al sistema de fermentación en el sitio.

Ventajosamente, la presente invención reduce los costos de capital y mano de obra para producir microorganismos y sus metabolitos. Además, el proceso de cultivo de la presente invención reduce o elimina la necesidad de concentrar o de otra manera procesar microbios después de completar el cultivo.

La portabilidad puede resultar en ahorros significativos de costos ya que los inóculos para las composiciones basadas en microbios se pueden producir en, o cerca, del sitio de

inoculación prevista. Ventajosamente, el inóculo se puede producir en el sitio utilizando materiales de origen local si se desea, reduciendo así los obstáculos logísticos y los costos de transporte y envío. Además, los productos finales producidos al modificar la escala del inóculo pueden incluir microbios viables en el momento de la aplicación.

Las composiciones producidas por la presente invención pueden usarse para inocular sistemas de fermentación a gran escala para su uso en una amplia variedad de aplicaciones de la industria petrolera. Estas aplicaciones incluyen, pero no se limitan a, la mejora de la recuperación de petróleo crudo; reducción de la viscosidad del aceite; eliminación de parafina de varillas, tubos, revestimientos y bombas; equipo de petróleo inhibición o prevención de la corrosión; fluidos de fractura; reducción de la concentración de H_2S en petróleo crudo extraído; así como la limpieza de tanques, líneas de flujo y tuberías.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

La **figura 1** muestra un dispositivo de acuerdo con una realización de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona dispositivos y métodos para producir composiciones basadas en microbios que pueden usarse en la industria del petróleo y el gas, la agricultura, la biorremediación, la acuicultura y muchas otras aplicaciones.

5 Específicamente, la presente invención proporciona métodos y materiales para el cultivo eficiente de microorganismos y la producción de subproductos de crecimiento microbiano. La presente invención también proporciona dispositivos para dicho cultivo y producción.

10 Más específicamente, la presente invención proporciona un dispositivo de fermentación móvil que puede usarse y transportarse a bajo costo sin requerir capacitación o habilidad especial.

En realizaciones específicas, el dispositivo y los métodos se
15 usan para producir inóculos de levadura y hongos. En ciertas realizaciones, el dispositivo y los métodos se usan para la producción de inóculos de levadura *Starmerella bombicola*.

En una realización, el dispositivo de la presente invención comprende un tambor giratorio soportado por una estructura. La
20 estructura puede tener ruedas para facilitar el movimiento, aunque esto no es necesario. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir dos ruedas en un lado sin ruedas en el otro lado para que el dispositivo pueda inclinarse para el transporte utilizando las ruedas y dejarse sobre una superficie para

permanecer en su lugar (como se muestra en la Figura 1). Alternativamente, el dispositivo puede incluir tres o más ruedas. La rotación del tambor se logra usando un motor. El motor puede funcionar, por ejemplo, con electricidad o gas.

5 Preferiblemente, el motor es un motor eléctrico que puede conectarse a una fuente de alimentación. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir una batería como fuente de alimentación o puede derivar energía de una fuente externa (por ejemplo, a través de un cable de alimentación o mediante una
10 transferencia inalámbrica de energía).

El tambor también se puede conectar a un sistema de aireación que comprende, por ejemplo, una bomba de aire. Esto sirve para proporcionar aire a la superficie del cultivo dentro del tambor y también puede servir como un medio para regular la
15 temperatura interna.

Los deflectores se pueden unir a la superficie interna del tambor, para ayudar en la agitación y aireación del cultivo. Mientras el tambor gira, el cultivo se mezcla en él y se oxigena con aire del medio ambiente y con el aire suministrado por el
20 sistema de aireación.

En realizaciones preferidas, el dispositivo funciona continuamente durante todo el proceso de cultivo. El dispositivo puede funcionar durante el tiempo que sea necesario para producir un volumen suficiente de cultivo, dependiendo de

la especie particular de microorganismo que se produzca. Por ejemplo, el dispositivo de mezcla puede funcionar continuamente durante 1, 2, 3, 4, 5 o más días (o cualquier parte del mismo). El dispositivo de la presente invención puede modificar la
5 escala dependiendo del uso previsto. Por ejemplo, el tambor puede variar en volumen desde unos pocos litros hasta varios cientos de litros o más.

Ventajosamente, el dispositivo puede autoesterilizarse eficazmente. Por ejemplo, los microorganismos cultivados
10 dentro del dispositivo de mezcla pueden ser cepas que producen metabolitos antimicrobianos o productos derivados, como los biosurfactantes. Por lo tanto, el cultivo de microbios en sí mismo puede proporcionar el control de microorganismos no deseados dentro del tambor, simultáneamente con el cultivo de
15 los microorganismos deseados. Alternativamente, o adicionalmente, el dispositivo puede esterilizarse con medios externos, por ejemplo, un agente esterilizante tal como peróxido de hidrógeno.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona
20 métodos de cultivo que simplifican la producción y facilitan la portabilidad de composiciones y productos útiles a base de microbios. Los métodos proporcionan el cultivo sumergido de composiciones de microbios adecuadas para inocular sistemas de fermentación a gran escala.

En ciertas realizaciones, el método comprende agregar al tambor del dispositivo de fermentación al menos un tipo de microorganismo y, opcionalmente, nutrientes para los microorganismos; y permitir que el dispositivo de mezcla
5 funcione hasta que se haya producido una cantidad suficiente de inóculo. Los nutrientes pueden incluir, por ejemplo, una o más fuentes de carbono, proteínas, grasas, fuentes de nitrógeno, oligoelementos y/o factores de crecimiento (por ejemplo, vitaminas, reguladores de pH).

10 El inóculo producido por el método en cuestión puede usarse para inocular un sistema de fermentación presente en el sitio para la producción de grandes cantidades de composiciones basadas en microbios. En realizaciones preferidas, el dispositivo y los métodos en cuestión se pueden usar en el
15 sitio de tal manera que el cultivo de inóculo se pueda transferir directamente desde el dispositivo a un sistema de fermentación en el sitio a mayor escala.

En una realización, la presente invención proporciona además una composición de inóculo que comprende al menos un tipo de
20 microorganismo y/o al menos un metabolito microbiano producido por el microorganismo que ha crecido usando el dispositivo de la presente invención. Los microorganismos en la composición pueden estar en forma activa o inactiva. La composición también puede estar en forma seca o en forma líquida.

Ventajosamente, la presente invención reduce los costos de capital y mano de obra para producir microorganismos y sus metabolitos. Además, el proceso de cultivo de la presente invención reduce o elimina la necesidad de concentrar o de otra
5 manera procesar microbios después de completar el cultivo.

La portabilidad puede resultar en ahorros significativos de costos ya que los inóculos para composiciones basadas en microbios se pueden producir en, o cerca, del sitio de inoculación prevista. Ventajosamente, el inóculo se puede
10 producir en el sitio utilizando materiales de origen local si se desea, reduciendo así los obstáculos logísticos y los costos de transporte y envío. Además, los productos finales producidos al modificar la escala del inóculo pueden incluir microbios viables en el momento de la aplicación, lo que puede aumentar
15 la efectividad del producto.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención aprovecha el poder de los microorganismos locales de origen natural y sus subproductos metabólicos. El uso de poblaciones microbianas locales puede ser ventajoso en entornos que
20 incluyen, pero no están limitados a, la remediación ambiental (como en el caso de un derrame de petróleo), la cría de animales, la acuicultura, la silvicultura, el manejo de pastos, el manejo del césped, la producción ornamental hortícola, la

eliminación y tratamiento de desechos, minería, recuperación de petróleo y salud humana, incluso en lugares remotos.

Las composiciones producidas por la presente invención pueden usarse para inocular sistemas de fermentación a gran escala para su uso en una amplia variedad de aplicaciones de la industria petrolera. Estas aplicaciones incluyen, pero no están limitadas a, la mejora de la recuperación de petróleo crudo; reducción de la viscosidad del aceite; eliminación de parafina de varillas, tubos, revestimientos y bombas; equipo de petróleo inhibición o prevención de corrosión; fluidos de fractura; reducción de la concentración de H_2S en petróleo crudo extraído; así como la limpieza de tanques, líneas de flujo y tuberías.

15 **Definiciones Seleccionadas**

Como se usa en el presente documento, "composición basada en microbios" significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por lo tanto, la composición basada en microbios puede comprender los propios microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano. Las células pueden estar en estado vegetativo o en forma de esporas, o una mezcla de ambas. Las células pueden ser planctónicas o en forma de biopelícula, o una mezcla de ambas.

Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de la membrana celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Las células pueden estar intactas o lisadas. En realizaciones preferidas, las
5 células están en estado vegetativo y están presentes, con caldo en el que se cultivaron, en la composición basada en microbios. Las células pueden estar presentes en, por ejemplo, una concentración de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} o 1×10^{11} o más células por mililitro de la composición.

10 La presente invención proporciona además “productos a base de microbios” o “productos de cultivo”, que son productos que deben aplicarse en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto a base de microbios puede ser simplemente la composición basada en microbios cosechada del proceso de
15 cultivo de microbios. Alternativamente, el producto a base de microbios puede comprender ingredientes adicionales que se han agregado. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, tampones, vehículos apropiados, como agua, nutrientes añadidos para apoyar el crecimiento microbiano adicional y/o
20 agentes que faciliten el seguimiento de los microbios y/o la composición en el entorno al que se aplica. El producto a base de microbios también puede comprender mezclas de composiciones basadas en microbios. El producto a base de microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición a

base de microbios que se han procesado de alguna manera, tales como, pero sin limitarse a, la filtración, centrifugación, lisis, secado, purificación y similares.

El término "inóculo" está incluido dentro del término "producto a base de microbios". Como se usa en el presente documento, inóculo significa un producto a base de microbios que puede usarse, por ejemplo, como un cultivo de semillas para inocular un sistema o proceso de fermentación a mayor escala. El inóculo se puede modificar de escala en dicho sistema de fermentación para producir las cantidades deseadas de composiciones y productos a base de microbios.

Como se usa en el presente documento, "sistema de fermentación en el sitio" se refiere a un sistema usado para producir composiciones y/o productos a base de microbios en o cerca del sitio de aplicación de estas composiciones y/o productos a base de microbios.

Como se usa en el presente documento, "cosechado" se refiere a eliminar parte o la totalidad de la composición basada en microbios de un recipiente de crecimiento.

Como se usa en el presente documento, el término "control" usado en referencia a la actividad producida por los biosurfactantes (en otro agente activo) o microorganismos productores de biosurfactantes se extiende al acto de matar,

deshabilitar o inmovilizar plagas o de otra manera hacer que las plagas sean sustancialmente incapaces de causar daño.

Diseño y operación de dispositivos de mezcla

La FIG. 1 representa un dispositivo de fermentación de acuerdo con una realización de la presente invención. Con referencia a la FIG. 1, el dispositivo **10** puede incluir un tambor giratorio **100** soportado por una estructura **200**. La estructura **200** puede tener ruedas **300** para facilitar el movimiento, aunque esto no es necesario. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir dos ruedas **300** en un lado sin ruedas en el otro lado **400** para que el dispositivo pueda inclinarse para el transporte usando las ruedas y colocarse sobre una superficie para permanecer en su lugar. Alternativamente, el dispositivo puede incluir tres o más ruedas **300** (ya sea de manera que todos los puntos de contacto con el suelo sean ruedas, o si bien incluye una sección **400** sin ruedas). Las ruedas **300** pueden tener bloqueos de rueda para mantener el dispositivo en su lugar cuando no está en transporte, particularmente en el caso en que todos los puntos de contacto con el suelo son ruedas. La rotación del tambor **100** se logra utilizando un motor. El motor puede funcionar, por ejemplo, con electricidad o gas. Preferiblemente, el motor es un motor eléctrico que puede conectarse a una fuente de alimentación. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir una batería como fuente de alimentación o puede derivar energía de

una fuente externa (por ejemplo, a través de un cable de alimentación o mediante una transferencia inalámbrica de energía). El dispositivo **10** puede estar equipado con un medio para ajustar el ángulo del tambor **100**. Tal medio puede incluir,
5 por ejemplo, una palanca **500** y/o una bisagra u otro soporte giratorio en la estructura **200**.

En una realización, el tambor **100** del dispositivo **10** es un tambor giratorio que se puede cerrar para sostener, mezclar y hacer crecer un inóculo de cultivo sumergido. El tambor puede
10 estar hecho de, por ejemplo, vidrio, uno o polímeros, uno o más metales, una o más aleaciones metálicas, y/o combinaciones de los mismos.

El tambor **100** puede montarse en una estructura de soporte **200**. La estructura de soporte **200** puede tener ruedas **300**, lo que
15 facilita el transporte de todo el dispositivo sin requerir una gran habilidad, capacitación, costo o tiempo. Las ruedas **300** pueden estar hechas de, por ejemplo, uno o más polímeros, goma o cualquier material duradero adecuado para moverse a través de una variedad de paisajes, como los que se encuentran en
20 entornos agrícolas y de extracción de petróleo. La estructura **200** puede estar hecho, por ejemplo, de vidrio, uno o polímeros, uno o más metales, una o más aleaciones metálicas, y/o combinaciones de los mismos.

El tambor está operativamente conectado con un motor, como un motor eléctrico, que está conectado a una fuente de alimentación. El motor permite que el tambor gire continuamente a una velocidad de, por ejemplo, 10 a 30 rpm y, más
5 preferiblemente, 15 a 25 rpm.

El tambor también se puede conectar a un sistema de aireación que comprende, por ejemplo, una bomba de aire. La bomba de aire proporciona aire al interior del tambor, aireando así la superficie del cultivo en movimiento dentro del tambor.
10 Mientras el tambor gira, el cultivo se mezcla en él y se oxigena por el aire suministrado por el sistema de aireación. En algunas realizaciones, el aire se puede calentar o enfriar para ayudar a regular la temperatura interna del tambor y el entorno de cultivo.

15 El ángulo del eje del tambor con respecto al suelo puede ser de 0° a 90° . El ángulo es preferiblemente inferior a 90° para aumentar el área superficial del caldo de cultivo dentro del tambor. El ángulo puede ser horizontal (es decir, 0°) o cercano a la horizontal. El ángulo puede ser, por ejemplo, de
20 aproximadamente 5° a aproximadamente 75° , o de aproximadamente 10° a aproximadamente 60° . El dispositivo puede estar equipado con un medio para ajustar el ángulo.

Junto con la optimización del ángulo del eje del tambor, la forma del tambor también se optimiza preferiblemente de modo

que una superficie máxima de cultivo se encuentre expuesta al suministro de aire durante el proceso de cultivo. El tambor puede tener la forma de, por ejemplo, un cilindro, o cualquier tipo de cilindro modificado, aunque las realizaciones no están
5 limitadas al mismo. Los cilindros modificados pueden incluir cilindros cónicos, cilindros en forma de lata o cilindros que tienen un diámetro más ancho en el medio que en cualquier extremo.

Además, los deflectores pueden estar presentes en la superficie
10 interna del tambor para ayudar en la adecuada agitación y aireación del cultivo. Preferiblemente, de 3 a 4 deflectores están espaciados de manera uniforme, o aproximadamente uniforme, alrededor de la circunferencia interna del tambor y alineados de modo que sean paralelos al eje de rotación del
15 tambor. Alternativamente, los deflectores se pueden disponer de manera que sean perpendiculares al eje de rotación del tambor.

En realizaciones preferidas, el dispositivo funciona continuamente durante todo el proceso de cultivo. El
20 dispositivo puede funcionar durante el tiempo que sea necesario para producir un volumen suficiente de cultivo, dependiendo de la especie particular de microbio que se produzca. Por ejemplo, el dispositivo de mezcla puede funcionar continuamente durante varios días. En realizaciones específicas, el dispositivo de

mezcla funciona continuamente durante 1, 2, 3, 4, o hasta 5 días o más, o cualquier parte del mismo.

En una realización, el dispositivo de mezcla es un biorreactor móvil o portátil que puede proporcionarse para la producción en el sitio de un inóculo que incluye una cantidad adecuada de una cepa de microorganismo deseada. La cantidad de inóculo de cultivo líquido producido puede ser, por ejemplo, de 2 a 500 litros, de 5 a 250 litros, de 10 a 100 litros, de 15 a 75 litros, de 20 a 50 litros o de 35 a 40 litros. Debido a que el inóculo se genera en el sitio de la aplicación, sin recurrir a procesos de estabilización, preservación, almacenamiento y transporte de producción convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microorganismos vivos, lo que requiere un volumen mucho menor de la composición de microorganismos para su uso en un sistema de fermentación en el sitio. Esto permite un biorreactor reducido (por ejemplo, tanques de fermentación más pequeños, suministros más pequeños de material de partida, nutrientes, agentes de control de pH y agente antiespumante, etc.) que facilita la movilidad y portabilidad del sistema.

El dispositivo de la presente invención puede modificarse de escala dependiendo del uso previsto. Por ejemplo, el tambor puede variar en volumen desde unos pocos litros hasta varios cientos de litros, dependiendo de cuánto inóculo se necesitará

para inocular un sistema de fermentación específico. El tambor puede ser, por ejemplo, de 1 litro a 5,000 litros o más. Típicamente, el tambor puede tener de 10 a 1,500 litros, preferiblemente de 50 a 500 litros, y más preferiblemente de 100 a 200 litros.

En una realización, el dispositivo tiene controles/sensores funcionales o puede conectarse a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de cultivo, tales como pH, oxígeno, presión, temperatura, potencia del eje del agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de metabolitos.

En una realización, el dispositivo tiene sus propios controles y sistemas de medición para al menos temperatura y pH. Además de monitorear y controlar la temperatura y el pH, el tambor también puede tener la capacidad de monitorear y controlar, por ejemplo, oxígeno disuelto, agitación, formación de espuma, pureza de cultivos microbianos, producción de metabolitos deseados y similares.

En una realización adicional, el dispositivo también puede controlar el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, medición del número de células y fases de crecimiento). Alternativamente, puede tomarse una muestra diaria del recipiente y someterse a enumeración mediante técnicas conocidas en la materia, tales como la técnica de

dilución en placa. La dilución en placa es una técnica simple utilizada para estimar el número de bacterias en una muestra. La técnica también puede proporcionar un índice por el cual se pueden comparar diferentes entornos o tratamientos.

5 En una realización, el medio de cultivo, el aire y el equipo utilizado en el método y el proceso de cultivo se esterilizan. El equipo de cultivo, como el reactor/recipiente, puede estar separado de, pero conectado a, una unidad de esterilización, por ejemplo, una autoclave. El equipo de cultivo también puede
10 tener una unidad de esterilización que esteriliza in situ antes de comenzar la inoculación, por ejemplo, usando vapor. El aire puede esterilizarse por métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, el aire ambiental puede pasar al menos a través de un filtro antes de ser añadido en el recipiente. En otras
15 realizaciones, el medio puede pasteurizarse o, opcionalmente, no añadirse calor en absoluto, donde el uso de baja actividad de agua y bajo pH puede explotarse para controlar el crecimiento bacteriano.

Antes del cultivo, el tambor se puede lavar con un agente
20 esterilizante, como una solución de peróxido de hidrógeno (por ejemplo, de 1.0% a 3.0% de peróxido de hidrógeno); esto se puede hacer antes o después de un enjuague con agua caliente a, por ejemplo, 80 a 90 grados Celsius para inhibir o prevenir la contaminación. Los componentes del medio de cultivo (por

ejemplo, la fuente de carbono, agua, fuente de lípidos, micronutrientes, etc.) también pueden descontaminarse a temperatura y/o descontaminarse con peróxido de hidrógeno (potencialmente seguido de la neutralización del peróxido de hidrógeno usando un ácido como HCl, H₂SO₄, etc.).

Ventajosamente, el dispositivo también puede autoesterilizarse. Por ejemplo, los microorganismos elegidos para el cultivo dentro del dispositivo de mezcla pueden ser cepas que se sabe que producen metabolitos antimicrobianos o productos derivados, como los biosurfactantes. Por lo tanto, el cultivo de microbios en sí mismo puede proporcionar el control de microorganismos no deseados dentro del tambor, simultáneamente con el cultivo de los microorganismos deseados. La temperatura de cultivo utilizada de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 25 a 40 grados Celsius, aunque el proceso puede funcionar fuera de este rango. El microbio puede cultivarse en un rango de pH de aproximadamente 2 a 10 y, más específicamente, en un rango de pH de aproximadamente 3 a 5 (ajustando el pH de forma manual o automática usando bases, ácidos y tampones; por ejemplo, HCl, KOH, NaOH, H₃PO₄). La invención también se puede practicar fuera de este rango de pH.

El cultivo de levadura puede comenzar a un primer pH (por ejemplo, un pH de 4.0 a 4.5) y luego cambiar a un segundo pH

(por ejemplo, un pH de 3.2 a 3.5) durante el resto del proceso para ayudar a evitar la contaminación además de producir otros resultados deseables (el primer pH puede ser mayor o menor que el segundo pH). Se pueden lograr resultados preferibles
5 manteniendo la concentración de oxígeno disuelto por encima del 10, 15, 20 o 25% de saturación durante el cultivo. En una realización, el inóculo no necesita procesarse adicionalmente después del cultivo (por ejemplo, la levadura, los metabolitos y las fuentes de carbono restantes no necesitan separarse de
10 los soforolípidos). Las propiedades físicas (por ejemplo, viscosidad, densidad, etc.) también se pueden ajustar utilizando diversos productos químicos y materiales conocidos en la materia.

Se pueden agregar una o más sustancias antimicrobianas al medio
15 de cultivo (por ejemplo, estreptomicina, oxitetraciclina, soforolípidos y ramnolípidos) para inhibir o prevenir la contaminación, antes, durante o después de la fermentación. Se pueden agregar una o más fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico al medio (por ejemplo, proteínas, aminoácidos,
20 extractos de levadura, autolisados de levadura, amonio o sales de amonio, urea, peptona de maíz, hidrolizado de caseína y proteína de soja).

Microorganismos

Los microorganismos cultivados de acuerdo con la presente invención pueden ser, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos u organismos multicelulares. En realizaciones preferidas, el microorganismo es una levadura. En realizaciones particularmente preferidas, los microbios son de las cepas del clado *Starmerella*.

En una realización, los microorganismos son bacterias, que incluyen bacterias grampositivas y gramnegativas. Estas bacterias pueden ser, pero no se limitan a, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Rhizobium* (por ejemplo, *Rhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, y *Rhizobium etli*), *Bradyrhizobium* (por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum* y *B. parasponia*), *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquifaciens*), *Azobacter* (por ejemplo, *Azobacter vinelandii*, y *Azobacter chroococcum*), *Arhrobacter* (por ejemplo, *Agrobacterium radiobacter*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver)), *Azospirillum* (por ejemplo, *Azospirillum brasiliensis*), *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter* (por ejemplo, *C. xyli* subsp. *xyli* y *C. xyli* subsp. *cynodontis*), *cyanobacteria*, *Pantoea* (por ejemplo, *Pantoea agglomerans*), *Sphingomonas* (por ejemplo, *Sphingomonas*

paucimobilis), *Streptomyces* (por ejemplo, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces aureus*, y *Streptomyces kasugaensis*), *Streptoverticillium* (por ejemplo, *Streptoverticillium rimofaciens*), *Ralslonia* (por ejemplo, *Ralslonia eulrophia*), *Rhodospirillum* (por ejemplo, *Rhodospirillum rubrum*), *Xanthomonas* (por ejemplo, *Xanthomonas campestris*), *Erwinia* (por ejemplo, *Erwinia carotovora*), *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium bravidaciens*, y *Clostridium malacusomae*) y
5 combinaciones de las mismas.

En una realización, el microorganismo es un hongo (incluida la levadura), que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, *Starmerella*, Micorriza (por ejemplo, micorrizas vesiculares-arbusculares (VAM), micorrizas arbusculares (AM)),
15 *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Pythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (por ejemplo, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. hamatum*), *Rhizopus spp*, hongos endofíticos (por ejemplo, *Piriiformis indica*), *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*,
20 *Saccharomyces boulardii sequela* y *Saccharomyces torula*), *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*), *Pichia spp* (por ejemplo, *Pichia pastoris*) y combinaciones de las mismas.

En una realización, se cultiva un único tipo de microbio en el dispositivo de mezcla. En realizaciones alternativas, múltiples microbios, que pueden crecer juntos sin efectos nocivos sobre el crecimiento o el producto resultante, pueden
5 crecer juntos en el dispositivo de mezcla. Puede haber, por ejemplo, 2 a 3 o más microbios diferentes creciendo en el dispositivo al mismo tiempo.

Cultivo y Medio de Crecimiento

10 La presente invención proporciona métodos para la producción eficiente de cultivos de microbios sumergidos modificados a escala. El método puede incluir proporcionar todos los materiales necesarios para el proceso de cultivo sumergido, aunque se espera que el agua dulce se suministre desde una
15 fuente local.

En una realización, el método comprende proporcionar una levadura viable, u otro microbio, dentro del tambor del dispositivo de mezcla. Se puede incluir una variedad de cepas que son capaces de acumular cantidades significativas de
20 biosurfactantes glicolípidos. Más específicamente, el método puede comprender agregar una o más cepas fúngicas viables capaces de controlar plagas, biorremediación, mejorar la recuperación de petróleo y otros fines útiles, por ejemplo, *Starmerella (Candida) bombicola*, *Candida apicola*, *Candida*

batistae, *Candida floricola*, *Candida riidocensis*, *Candida stellate*, *Candida kuoi*, *Candida sp. NRRL Y-27208*, *Rhodotorula bogoriensis sp.*, *Wickerhamiella domericqiae*, así como cualquier otra cepa productora de soforolípidos del clado

5 *Starmerella*.

En una realización, el medio de cultivo usado de acuerdo con la presente invención, puede contener nutrientes suplementarios para el microorganismo. Típicamente, estos incluyen fuentes de carbono, proteínas y/o grasas, fuentes de

10 nitrógeno, oligoelementos y/o factores de crecimiento (por ejemplo, vitaminas, reguladores de pH). Será evidente para un experto en la materia que la concentración de nutrientes, el contenido de humedad, el pH y similares se pueden modular para optimizar el crecimiento de un microbio particular.

15 Cada fuente de carbono, fuente de lípidos, fuente de nitrógeno y/o fuente de micronutrientes se puede proporcionar en un empaque individual que se puede agregar al tambor del dispositivo de mezcla en los momentos apropiados durante el proceso de cultivo. Cada uno de los empaques puede incluir

20 varios subempaques que se pueden agregar en puntos específicos (por ejemplo, cuando la levadura, el pH y/o los niveles de nutrientes están por encima o por debajo de una concentración específica) o veces__(por ejemplo, después de 10 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, etc.) durante el proceso de cultivo.

La fuente de lípidos puede incluir, por ejemplo, aceites o grasas de origen vegetal o animal que contienen ácidos grasos libres o sus sales o sus ésteres, incluidos los triglicéridos. Los ejemplos de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos libres y esterificados que contienen de 16 a 18 átomos de carbono, fuentes de carbono hidrófobas, aceite de palma, grasas animales, aceite de coco, ácido oleico, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de canola, ácido esteárico y palmítico. Otras fuentes de carbono pueden incluir uno o más azúcares como glucosa, xilosa, manosa, sacarosa, galactosa, manitol, sorbosa, ribosa, arbutina, rafinosa, glicerol, eritritol, xilitol, gluconato, citrato, melaza, almidón hidrolizado, jarabe de maíz y material celulósico hidrolizado incluyendo glucosa.

El método puede comprender agregar una o más fuentes de micronutrientes, tales como potasio, magnesio, calcio, zinc y manganeso, preferiblemente como sales; fósforo, tal como de fosfatos; y otros componentes estimulantes del crecimiento. Se pueden incluir una o más fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, tales como proteínas, aminoácidos, extractos de levadura, autolisados de levadura, amoníaco o sales de amonio, urea, peptona de maíz, hidrolizado de caseína y proteína de soja.

El método puede comprender agregar una o más sustancias antimicrobianas para inhibir o prevenir la contaminación durante el cultivo (por ejemplo, estreptomicina, oxitetraciclina, soforolípido y ramnolípido). Además, el
5 método puede incluir materiales de descontaminación previos al cultivo, como lejía y peróxido de hidrógeno. La lejía y el peróxido de hidrógeno pueden venir en forma concentrada y luego diluirse en el sitio de fermentación antes de su uso. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno puede proporcionarse en forma
10 concentrada y diluirse para formular peróxido de hidrógeno de 1.0% al 3.0% (en peso o volumen) para la descontaminación previa al enjuague.

El método también puede comprender la adición de una o más sustancias para ajustar el pH, como bases, ácidos y tampones
15 (por ejemplo, HCl, KOH, NaOH y/o H_3PO_4 , H_2SO_4 , etc). El ajuste del pH se puede lograr por medios automáticos o se puede hacer manualmente. El ajuste automático de pH puede incluir una sonda de pH y un dispositivo electrónico para dispensar las sustancias de ajuste de pH de manera adecuada, de acuerdo con
20 las mediciones de pH. El usuario puede establecer el pH en un número específico o puede pre-programarse para cambiar el pH en conformidad durante todo el proceso de cultivo. Si el ajuste de pH se realiza manualmente, las herramientas de medición de

pH conocidas en la materia se pueden usar para las pruebas manuales.

Se puede usar un sensor de temperatura, como un termómetro o termopar, para controlar la temperatura, y el termómetro puede
5 ser manual o automático. Un termómetro automático puede manejar las fuentes de calor y enfriamiento de manera adecuada para controlar la temperatura durante todo el proceso de cultivo.

En una realización, el método incluye suplementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede
10 estar, por ejemplo, en una forma inorgánica, como nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea y cloruro de amonio, o una forma orgánica, como proteínas y aminoácidos. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse independientemente o en una combinación
15 de dos o más.

El método puede comprender además suplementar el cultivo con una fuente de carbono. La fuente de carbono es típicamente un carbohidrato, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y maltosa; ácidos orgánicos tales
20 como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico y ácido pirúvico; alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y glicerol; grasas y aceites tales como aceite de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva,

aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de linaza; etc. Estas fuentes de carbono pueden usarse independientemente o en una combinación de dos o más.

En una realización, se incluyen factores de crecimiento y oligoelementos para microorganismos en el medio. Los nutrientes inorgánicos, incluidos los oligoelementos como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y cobalto también pueden incluirse en el medio.

En una realización, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas pueden ser, por ejemplo, dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato dipotásico, hidrógeno fosfato disódico, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio, carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas pueden usarse independientemente o en una combinación de dos o más.

Ventajosamente, el método proporciona una oxigenación fácil del cultivo en crecimiento con, por ejemplo, movimiento lento del aire para eliminar el aire que contiene poco oxígeno y la introducción de aire oxigenado. El aire oxigenado puede ser aire ambiental suplementado periódicamente, como diariamente. En algunas realizaciones, el método para el cultivo puede comprender además la adición de ácidos y/o antimicrobianos

adicionales en el medio líquido antes y/o durante el proceso de cultivo. Los agentes antimicrobianos o antibióticos se usan para inhibir o prevenir la contaminación del cultivo. Además, también se pueden agregar agentes antiespumantes para inhibir
5 o prevenir la formación y/o acumulación de espuma cuando se produce gas durante el cultivo y la fermentación.

En una realización, el método para el cultivo de microorganismos se lleva a cabo a aproximadamente 5° a aproximadamente 100°C, preferiblemente, 15° a 60°C, más
10 preferiblemente, 25 a 50°C. En una realización adicional, el cultivo puede ser llevado a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra realización, el cultivo puede estar sujeto a temperaturas cambiantes.

En una realización, el nivel de humedad de la mezcla debería ser adecuado para el microorganismo de interés. Por ejemplo,
15 el nivel de humedad puede variar del 20% al 90%, preferiblemente, del 30 al 80%, más preferiblemente, del 40 al 60%.

En una realización, el pH de la mezcla debería ser adecuado
20 para el microorganismo de interés. Se pueden usar sales tamponantes y reguladores de pH, como carbonatos y fosfatos, para estabilizar el pH cerca de un valor óptimo. Cuando los iones metálicos están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio líquido.

Los microbios se pueden cultivar en forma planctónica o como biopelícula. En el caso de la biopelícula, el recipiente puede tener dentro un sustrato sobre el cual los microbios pueden crecer en un estado de biopelícula. El sistema también puede
5 tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulos (como el esfuerzo cortante) que alienta y/o mejora las características de crecimiento de la biopelícula.

Preparación de Productos a Base de Microbios

10 Los productos a base de microbios de la presente invención incluyen productos que comprenden los microbios y/o los subproductos de crecimiento microbiano y, opcionalmente, el medio de crecimiento y/o ingredientes adicionales tales como, por ejemplo, agua, vehículos, adyuvantes, nutrientes,
15 modificadores de la viscosidad, y otros agentes activos.

Los productos a base de microbios de la presente invención pueden ser, por ejemplo, inoculantes microbianos, biopesticidas, fuentes de nutrientes, agentes de remediación, productos para la salud y/o biosurfactantes.

20 Un producto a base de microbios de la presente invención es un inóculo que comprende el medio de cultivo que contiene el microorganismo y/o los subproductos de crecimiento microbiano producidos por el microorganismo y/o cualquier nutriente residual. El producto del método de cultivo puede usarse

directamente sin extracción ni purificación. Si se desea, la extracción y la purificación se pueden lograr fácilmente utilizando métodos o técnicas de extracción estándar conocidos por los expertos en la materia.

5 Los microorganismos en el inóculo pueden estar en forma activa o inactiva. El inóculo se puede usar sin más estabilización, preservación y almacenamiento. Ventajosamente, el uso directo de estos inóculos preserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por
10 agentes extraños y microorganismos indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

El inóculo puede extraerse del tambor y transferirse mediante, por ejemplo, tuberías para su uso inmediato.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el
15 inóculo puede comprender caldo en el que se cultivaron los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% de caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, en cualquier parte desde 0% al 100%, incluidos todos los
20 porcentajes intermedios.

La presente invención proporciona además materiales y métodos para la producción de biomasa (por ejemplo, material celular viable), metabolitos extracelulares (por ejemplo, moléculas pequeñas y grandes) y/o componentes intracelulares (por

ejemplo, enzimas y otras proteínas). Los microbios y los subproductos de crecimiento microbiano de la presente invención también se pueden usar para la transformación de un sustrato, tal como un mineral, en el que el sustrato transformado es el
5 producto.

La presente invención proporciona además productos a base de microbios, así como usos para estos productos para lograr resultados beneficiosos en muchos entornos, incluyendo, por ejemplo, la biorremediación mejorada y minería; eliminación y
10 tratamiento de residuos; mejorar la ganadería y la salud de otros animales; y promover la salud y la productividad de las plantas mediante la aplicación de uno o más de los productos a base de microbios.

En una realización, la presente invención proporciona un método
15 para mejorar la salud de la planta y/o aumentar el rendimiento del cultivo al modificar la escala del producto a base de microbios descrito aquí, por ejemplo, en un sistema de fermentación en sitio, y aplicando el producto escalado al suelo, semilla, o partes de plantas. En otra realización, la
20 presente invención proporciona un método para aumentar el rendimiento de cultivos o plantas que comprende múltiples aplicaciones del producto modificado a escala.

En otra realización, el método para producir subproductos de crecimiento microbiano puede comprender además etapas de

concentración y purificación del subproducto derivado de interés.

En una realización, la composición es adecuada para la agricultura. Por ejemplo, la composición se puede modificar a
5 escala y usar para tratar el suelo, las plantas y las semillas. La composición también se puede usar como pesticida.

En una realización, la presente invención proporciona además personalizaciones a los materiales y métodos de acuerdo con las necesidades locales. Por ejemplo, el método para el cultivo
10 de microorganismos puede usarse para cultivar aquellos microorganismos ubicados en el suelo local o en un pozo de petróleo específico o sitio de contaminación. En realizaciones específicas, los suelos locales pueden usarse como sustratos sólidos en el método de cultivo para proporcionar un entorno
15 de crecimiento nativo. Ventajosamente, estos microorganismos pueden ser beneficiosos y más adaptables a las necesidades locales.

EJEMPLOS

20 Se puede obtener una mayor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas a partir de los siguientes ejemplos, dados a modo de ilustración. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos, aplicaciones, realizaciones y variantes de la presente invención. No deben

considerarse como limitantes de la invención. Se pueden hacer numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

EJEMPLO 1: DISPOSITIVO DE MEZCLA Y CULTIVO Y MODOS DE 5 FUNCIONAMIENTO

Se construyó un dispositivo de mezcla portátil y distribuible como se muestra en la Figura 1. El dispositivo tiene un tambor giratorio de plástico soportado por una estructura que tiene ruedas de goma. Se colocan de tres a cuatro deflectores
10 alrededor de la circunferencia interna del tambor.

La rotación del tambor funciona con un motor eléctrico conectado a una fuente de alimentación, lo que permite que el tambor gire a una velocidad de 15 a 25 rpm. El tambor tenía un volumen de trabajo de 100 litros (L) para cultivar la levadura
15 *Starmerella* para la producción de células y metabolitos (sin embargo, el tamaño y la escala pueden variar de acuerdo con la aplicación requerida). El dispositivo es particularmente adecuado para el cultivo sumergido de inóculos de levadura del clado *Starmerella* que son adecuados para la inoculación de
20 sistemas de fermentación en sitio a gran escala.

Con el fin de reducir aún más el costo de producción de cultivos y asegurar la escalabilidad de la tecnología, el sistema no necesita ser esterilizado utilizando métodos tradicionales. En cambio, se puede usar un método de saneamiento de recipientes

vacíos que incluye la aplicación de una corriente de vapor altamente presurizado durante 10 minutos a las superficies internas del tambor, seguido de un tratamiento nocturno de las superficies internas con 1 a 3% de peróxido de hidrógeno, preferiblemente 3% de peróxido de hidrógeno, mientras gira el tambor. Además, para reducir la posibilidad de contaminación, el agua utilizada para preparar el cultivo se puede filtrar a través de un filtro de 0.1 micras.

10 **Composición de Medios Nutrientes y Cultivo de Cultivos de Levadura**

El medio de cultivo utilizado para producir el inóculo de levadura comprendía los componentes que se muestran en la Tabla 1.

15 Tabla 1. Componentes para el medio de cultivo.

<u>Reactivo</u>	<u>Peso (g/L)</u>
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Fosfato monopotásico	2
Fosfato dipotásico	2
Sulfato de magnesio	0.5

Los componentes del medio de cultivo se esterilizaron en 1 L de peróxido de hidrógeno al 10% durante la noche. La

composición estéril se mezcló luego con agua filtrada en el tambor del mezclador.

La temperatura de cultivo fue generalmente alrededor de la temperatura ambiente, de 18 a 25° Celsius. El pH inicial del medio era de aproximadamente 5.5 a 6.0.

Bajo estas condiciones de cultivo, la producción industrialmente útil de biomasa, soforolípidos y otros metabolitos se logra después de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 días de cultivo, preferiblemente después de un tiempo de cultivo de aproximadamente 48 horas.

Al finalizar el cultivo, la concentración final de levaduras alcanzada es de aproximadamente 200 a 400 UFCs. El cultivo se puede usar luego para inocular un sistema de fermentación, en el que el cultivo se puede modificar a escala para una variedad de propósitos industriales.

Debe entenderse que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios en la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la materia y se incluirán dentro del espíritu y el alcance de esta aplicación.

Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes provisionales y publicaciones mencionadas o citadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad, incluidas todas las figuras y tablas, en la medida en que no

sean incompatibles con las enseñanzas explícitas de esta especificación.