

CO-CULTIVO DE MYXOBACTERIAS Y *PSEUDOMONAS* PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOTENSOACTIVOS Y OTROS METABOLITOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 62 / 862,180 presentada el 17 de junio de 2019, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El cultivo de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos es importante para la producción de una amplia variedad de biopreparaciones útiles. Los microorganismos desempeñan funciones cruciales, por ejemplo, en la industria alimentaria, farmacéutica, agricultura, recuperación de petróleo y gas, minería, remediación ambiental y gestión de desechos; sin embargo, uno de los factores que restringen la comercialización de productos basados en microbios han sido el costo por
15 densidad de propágulos, ya que es particularmente costoso e inviable producir microbios y sus subproductos de crecimiento a gran escala.

- El interés en los tensoactivos microbianos, es decir, los biotensoactivos, en particular, ha aumentado constantemente en los últimos años debido a la diversidad estructural, el respeto al medio ambiente, la selectividad, el rendimiento en condiciones extremas y las posibles aplicaciones
20 "ecológicas" en diversas industrias.

- Los biotensoactivos son un grupo estructuralmente diverso de sustancias tensioactivas producidas por microorganismos. Todos los biotensoactivos son anfífilos que comprenden dos partes: un residuo polar (hidrófilo) y un grupo no polar (hidrófobo). Debido a su estructura anfífilica, los biotensoactivos pueden, por ejemplo, aumentar el área superficial de sustancias hidrófobas insolubles
25 en agua, aumentar la biodisponibilidad de agua de tales sustancias y cambiar las propiedades de las superficies de las células bacterianas.

- Los biotensoactivos también pueden reducir la tensión interfacial entre el agua y el aceite y, por lo tanto, disminuir la presión hidrostática requerida para mover el líquido atrapado y superar el efecto capilar. Al acumularse en las interfaces, los biotensoactivos pueden reducir la tensión
30 interfacial, lo que lleva a la formación de estructuras micelares agregadas en solución. La formación de micelas proporciona un mecanismo físico para movilizar, por ejemplo, aceite en una fase acuosa en movimiento, y puede tener poderosas propiedades emulsionantes y demulsificantes. La capacidad de los biotensoactivos para formar poros y desestabilizar membranas biológicas también permite su uso como agentes antibacterianos, antifúngicos y hemolíticos para, por ejemplo, controlar plagas, inhibir
35 la adhesión microbiana a una variedad de superficies y/o prevenir la formación de biopelículas.

Además, los biotensoactivos son biodegradables, tienen baja toxicidad y pueden producirse económicamente utilizando recursos renovables.

Combinados con las características de baja toxicidad y biodegradabilidad, los biotensoactivos pueden ser útiles en una variedad de entornos e industrias. La mayoría de los organismos productores de biotensoactivos producen biotensoactivos en respuesta a la presencia de una fuente de hidrocarburos en el sustrato. Otros componentes de los medios, como la concentración de minerales y el pH, también pueden afectar significativamente la producción de biotensoactivos.

Los biotensoactivos microbianos son producidos por una variedad de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, que incluyen, por ejemplo, *Starmerella* spp. (p.ej, *S. bombicola*), *Pseudomonas* spp. (p.ej, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. syringae*); *Flavobacterium* spp.; *Bacilo* spp. (p.ej, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*); *Wickerhamomyces* spp. (p.ej, *W. anomalus*), *Candida* spp. (p.ej, *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. torulopsis*); *Saccharomyces* (p.ej, *S. cerevisiae*); *Pseudozima* spp. (p.ej, *P. aphidis*); *Rhodococcus* spp. (p.ej, *R. erythropolis*); *Ustilago* spp. (p.ej, *U. maydis*); *Arthrobacter* spp. ; *Campylobacter* spp. ; *Cornybacterium* spp. ; así como otros.

Hay múltiples tipos de biotensoactivos, que incluyen glicolípidos, lipopéptidos, flavolípidos y fosfolípidos de bajo peso molecular, y polímeros de alto peso molecular como lipoproteínas, complejos de lipopolisacárido-proteína y complejos de polisacárido-proteína-ácido graso. La cadena de hidrocarburo de un ácido graso actúa como un resto lipófilo común de una molécula biotensoactivo, mientras que la parte hidrófila puede estar formada, por ejemplo, por ésteres, alcoholes, carboxilatos, aminoácidos, péptidos y/o carbohidratos.

Un tipo importante de biotensoactivo son los ramnolípidos (RLP). Los RLP son glicolípidos que comprenden un residuo de ramnosa y una cola de ácido graso de ácido 3-(hidroxialcanoiloxi) alcanoico. Existen dos clases principales de ramnolípidos, mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos, que tienen uno o dos grupos ramnosa, respectivamente. La longitud y el grado de ramificación en la cola de ácidos grasos también pueden variar entre moléculas de RLP.

Más comúnmente, los RLP se producen utilizando a la bacteria. *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que puede ser fatal en humanos, particularmente aquellos con sistemas inmunológicos comprometidos. La naturaleza patógena de *P. aeruginosa* por lo tanto, limita la aplicación de RLP, en parte debido a los riesgos que presenta para las personas que trabajan con esta bacteria.

Los subproductos adicionales del crecimiento microbiano que pueden ser útiles en una variedad de industrias incluyen, por ejemplo, biopolímeros, ácidos, enzimas, antibióticos, antivirales, antifúngicos y disolventes; sin embargo, un factor limitante en la comercialización de productos

basados en microbios ha sido la dificultad de desarrollar operaciones seguras a gran escala para cultivar productos microbianos eficaces.

Existen dos formas principales para cultivar microbios y producir sus subproductos de crecimiento: cultivo sumergido (fermentación líquida) y cultivo de superficie (fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en inglés)). SSF utiliza sustratos sólidos, como salvado, bagazo y pulpa de papel, para cultivar microorganismos. Una ventaja de este método es que los materiales de desecho ricos en nutrientes se pueden reciclar fácilmente como sustratos. Además, los sustratos se utilizan de manera muy lenta y constante, por lo que el mismo sustrato se puede usar durante largos períodos de fermentación.

La fermentación sumergida utiliza sustratos líquidos de flujo libre, como melaza y caldo nutritivo. Los microbios en crecimiento pueden secretar compuestos bioactivos en el líquido que fluye.

Los microbios y sus subproductos de crecimiento tienen el potencial de desempeñar funciones muy benéficas en una variedad de industrias, incluidas las del petróleo, la agricultura y la cosmética; sin embargo, se necesitan métodos más seguros y eficientes para producir las grandes cantidades de productos basados en microbios, tales como ramnolípidos y sustancias similares a los RLP, que se requieren para tales aplicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos mejorados para producir biotensoactivos microbianos y otros metabolitos microbianos útiles. La ventaja de los métodos y productos basados en microbios de la presente invención es que son respetuosos con el medio ambiente, de fácil manejo y rentables.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona métodos para producir uno o más subproductos del crecimiento microbiano, comprendiendo los métodos el co-cultivo de una mixobacteria y una bacteria, *Pseudomonas* spp. De manera benéfica, en determinadas realizaciones, la biomasa celular total y/o la producción total de uno o más subproductos del crecimiento conseguidos cuando se utilizan los métodos de la presente invención es mayor que cuando se cultivan los cultivos puros de microbios individuales.

En una realización específica, la mixobacteria es *Myxococcus xanthus* y la *Pseudomonas* es *P. chlororaphis*. En realizaciones preferidas, la *Pseudomonas* es una cepa que no es patógena para los seres humanos, como, por ejemplo, *P. chlororaphis* cepa 111 (UCM B-111) o *P. chlororaphis* cepa 306 (UCM B-306). En ciertas realizaciones, más de una cepa de *Pseudomonas* se puede utilizar.

En una realización, los microorganismos se cultivan conjuntamente usando procesos de cultivo que varían de pequeña a gran escala. Estos procesos de cultivo pueden incluir, entre otros,

cultivo/fermentación sumergida, fermentación en estado sólido (SSF) e híbridos, modificaciones y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el proceso de cultivo es un proceso de alimentación por lotes.

5 En una realización, el co-cultivo se lleva a cabo usando fermentación sumergida. En una realización, se usa un híbrido de SSF y fermentación sumergida, en el que un vehículo de anclaje particulado se suspende en el medio de cultivo líquido para que sirva como un sitio para la unión celular y la formación de biopelículas. Esto es particularmente útil para el crecimiento de mixobacterias, que pueden exhibir un crecimiento mejorado en una superficie sólida.

10 El medio de crecimiento líquido puede comprender fuentes de, por ejemplo, carbono, nitrógeno, proteínas, vitaminas y/o minerales. En determinadas realizaciones, el medio nutritivo se personaliza para la producción de una alta concentración de uno o más subproductos específicos del crecimiento microbiano. En una forma de realización, el medio nutritivo líquido comprende un protector de espuma, tal como, por ejemplo, aceite de canola.

15 En algunas realizaciones, el vehículo de anclaje particulado se suspende en el medio de cultivo líquido antes, al mismo tiempo o después de que el medio de cultivo líquido se inocula con el primer y/o segundo microorganismo.

20 En una realización, el vehículo de anclaje puede ser cualquier material esterilizado adecuado para servir como sitio de nucleación para la unión y el crecimiento bacteriano. En algunas realizaciones, el material comprende una pluralidad de partículas finas individuales, por ejemplo, granos, que tienen un diámetro de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 5 mm. Las bacterias se adhieren a las partículas y se acumulan en ellas, produciendo masas portadoras de bacterias.

25 El vehículo de anclaje puede ser inerte o puede transportar y/o comprender nutrientes adicionales y/o inoculante microbiano. En determinadas formas de realización, el vehículo de anclaje puede ser poroso. El vehículo de anclaje puede comprender materiales sintéticos y/o materiales de origen natural.

30 En una realización, el portador de anclaje comprende bolas hechas, por ejemplo, de vidrio, un polímero (por ejemplo, ácido poliláctico (PLA)), agar o gelatina. En una realización, el vehículo de anclaje puede ser trozos de, por ejemplo, una esponja picada o una esponja. En una realización, el vehículo de anclaje puede comprender productos alimenticios, como semillas, nueces, frijoles o incluso trozos de fruta picada, como plátanos.

En realizaciones preferidas, el vehículo de anclaje comprende granos finos de celulosa y/o harina de maíz.

35 Favorablemente, el uso de el vehículo de anclaje proporciona una mayor producción de biomasa bacteriana debido, por ejemplo, al área de superficie incrementada en la que las bacterias pueden adherirse y acumularse. Además, la acumulación de biomasa bacteriana puede conducir a

aumentos en la producción de subproductos de crecimiento benéficos, como biotensoactivos y otros metabolitos.

En una realización, las bacterias crecen en forma de biopelícula sobre el vehículo de anclaje particulado. En una realización, algunas bacterias crecen en el medio de cultivo líquido y algunas bacterias crecen en el vehículo de anclaje particulado.

En algunas realizaciones, el método de cultivo utiliza un cultivo de alimentación por lotes. El reactor de fermentación se puede alimentar, por ejemplo, con aceite de canola (u otra solución antiespumante), fuentes de carbono (por ejemplo, glicerol), ajustadores de pH y/u otras fuentes de nutrientes adicionales según sea necesario. La "alimentación" del reactor de fermentación puede ocurrir, por ejemplo, a las 24 horas, a las 48 horas, o múltiples veces, por ejemplo, cada 24 a 48 horas.

Según los métodos de la presente invención, el primer y segundo microorganismo se pueden incubar en el sistema de fermentación durante un período de tiempo suficiente para lograr un efecto deseado, por ejemplo, producción de una cantidad deseada de biomasa celular o una cantidad deseada de uno o más subproductos del crecimiento microbiano. En algunas realizaciones, la fermentación ocurre durante 24 horas a 5 días o más, a una temperatura de 20 a 30 °C.

En realizaciones preferidas, los métodos de la presente invención pueden usarse para producir uno o más subproductos del crecimiento microbiano. En determinadas realizaciones, los subproductos del crecimiento comprenden uno o más biotensoactivos.

Los biotensoactivos según la presente invención pueden incluir, por ejemplo, glicolípidos, lipopéptidos, flavolípidos, fosfolípidos, polímeros de alto peso molecular, ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos, lipoproteínas, complejos de lipopolisacárido-proteína y/o complejos de polisacárido-proteína-grasa.

En realizaciones específicas, los métodos pueden usarse para producir biotensoactivos glicolípidos, tales como, por ejemplo, ramnolípidos (RLP), lípidos de trehalosa, lípidos de manosileritritol (MEL), lípidos de celobiosa y/o soforolípidos (SLP). En ciertas realizaciones, los métodos se pueden usar para producir de 5 a 30 g/L de glicolípidos. En realizaciones preferidas, los glicolípidos son ramnolípidos y/o glicolípidos de tipo RLP.

En determinadas realizaciones, se produce más de un tipo de biotensoactivo durante el co-cultivo, por ejemplo, otros glicolípidos y/o flavolípidos.

En algunas realizaciones, uno o más subproductos del crecimiento también pueden incluir otros metabolitos, por ejemplo, enzimas, biopolímeros, ácidos, disolventes, gases, proteínas, péptidos, aminoácidos, alcoholes, hormonas, lípidos, carbohidratos, antibióticos, pigmentos, y otros compuestos bioactivos. En una realización específica, los otros metabolitos son terpenos y/o terpenoides, como por ejemplo carotenoides.

Favorablemente, en determinadas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden dar como resultado la producción de biotensoactivos, terpenos y/o terpenoides y/u otros subproductos del crecimiento en concentraciones mayores que cuando se cultivan cultivos puros de los microbios individuales.

5 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona productos basados en microbios producidos según los métodos de la presente invención, así como sus usos, por ejemplo, en la mejora de la producción de petróleo, la biorremediación y la minería; eliminación y tratamiento de desechos; promover la salud y la productividad de las plantas; y recuperar y/o restaurar la salud de los suelos.

10 Los productos a base de microbios pueden comprender todo el cultivo producido según los métodos de la presente invención, incluyendo el primer y/o segundo microorganismo y/o sus subproductos de crecimiento, así como el medio de crecimiento residual, el vehículo de anclaje particulado y/o los nutrientes.

15 Los microorganismos pueden estar vivos, viables o en forma inactiva. Pueden estar en forma de biopelícula, células vegetativas, esporas y/o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, no hay microbios presentes, en donde la composición comprende subproductos del crecimiento microbiano, por ejemplo, biotensoactivos, que han sido extraídos del cultivo y, opcionalmente, purificados.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para producir microorganismos y sus subproductos de crecimiento. Favorablemente, los productos y métodos basados en microbios de la presente invención son respetuosos con el medio ambiente, de fácil manejo y rentables.

25 En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona métodos para mejorar la producción de uno o más subproductos del crecimiento microbiano, comprendiendo los métodos el co-cultivo de una mixobacteria y una cepa de *Pseudomonas* spp. En una realización específica, los subproductos del crecimiento incluyen biotensoactivos, tales como ramnolípidos y/o flavolípidos.

30 Los subproductos del crecimiento también pueden incluir otros metabolitos, por ejemplo, enzimas, biopolímeros, ácidos, disolventes, gases, proteínas, péptidos, aminoácidos, alcoholes, hormonas, lípidos, carbohidratos, antibióticos y otros compuestos orgánicos y/o bioactivos. En una realización específica, los otros metabolitos son terpenos y/o terpenoides, como por ejemplo carotenoides.

De manera favorable, en ciertas realizaciones, la biomasa celular total y/o la producción total de uno o más subproductos de crecimiento logrados según los métodos de la presente invención

pueden ser mayores que cuando los cultivos puros de los microbios individuales se cultivan por sí mismos.

Definiciones seleccionadas

- 5 Como se usa en este documento, una "biopelícula" es un agregado complejo de microorganismos, como bacterias, en el que las células se adhieren entre sí y/o a una superficie usando una matriz de polisacárido extracelular. Las células de las biopelículas son fisiológicamente distintas de las células planctónicas del mismo organismo, que son células individuales que pueden flotar o nadar en un medio líquido.
- 10 Como se usa en este documento, "co-cultivo" significa el cultivo de más de un microorganismo en un único sistema de fermentación. En algunos casos, los microorganismos interactúan entre sí, ya sea de forma antagónica o simbiótica, dando como resultado un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad deseada de crecimiento de biomasa celular o una cantidad deseada de producción de metabolitos. En una realización, esta relación antagonista o simbiótica puede dar
- 15 como resultado un efecto mejorado, por ejemplo, el efecto deseado puede magnificarse en comparación con lo que resulta de cultivar solo uno de los microorganismos por sí solo. En una realización ejemplar, un microorganismo, por ejemplo, un *Myxococcus* sp., puede servir como un estimulador para la producción de biotensoactivos u otros metabolitos por el otro microorganismo, por ejemplo, una *Pseudomonas* sp.
- 20 Como se usa en este documento, "potenciar" se refiere a mejorar y/o aumentar.
- Como se usa en este documento, "fermentación" se refiere al cultivo o crecimiento de células en condiciones controladas. El crecimiento puede ser aeróbico o anaeróbico.
- Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "aislado" o "purificado", polinucleótido, polipéptido, proteína, compuesto orgánico como una molécula pequeña
- 25 (p. ej., los descritos a continuación) u otro compuesto está sustancialmente libre de otros compuestos, como materia celular, genes o secuencias de genes, y/o aminoácidos o secuencias de aminoácidos, con los que está asociado en la naturaleza. Una cepa microbiana purificada o aislada se elimina del entorno en el que existe en la naturaleza y/o en el que se cultivó. Por tanto, la cepa aislada puede existir, por ejemplo, como un cultivo biológicamente puro o como esporas (u otras formas de la cepa).
- 30 En determinadas realizaciones, los compuestos purificados son al menos un 60% en peso del compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es al menos 75%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 99% en peso del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que es, preferiblemente, al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99% ó 100% (p/p) del deseado compuesto por peso. La pureza se mide mediante cualquier

método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Como se usa en el presente documento, la referencia a una "composición basada en microbios" significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por tanto, la composición basada en microbios puede comprender los propios microbios y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en estado vegetativo o en forma de esporas, o una mezcla de ambos. Los microbios pueden ser planctónicos o en forma de biopelícula, o una mezcla de ambos. Los subproductos del crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos (por ejemplo, biotensoactivos), componentes de la membrana celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. Las células o esporas pueden estar ausentes o presentes, por ejemplo, en una concentración de al menos 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} ó 1×10^{12} o más UFC por mililitro de composición.

Como se usa en este documento, un "producto basado en microbios" es un producto que se aplica en la práctica para lograr el resultado deseado. El producto a base de microbios puede ser simplemente una composición a base de microbios recolectada del proceso de cultivo. Alternativamente, el producto a base de microbios puede comprender otros ingredientes que se han añadido. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizadores, tampones, vehículos (por ejemplo, soluciones de agua o sal), nutrientes añadidos para apoyar un mayor crecimiento microbiano, potenciadores del crecimiento no nutritivos y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el medio ambiente al que se aplica. El producto a base de microbios también puede comprender mezclas de composiciones a base de 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, como, entre otros, filtrado, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa en este documento, "reduce" significa una alteración negativa de al menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% ó 100%.

Como se usa en este documento, "tensoactivo" significa un compuesto que reduce la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos, entre un líquido y un gas, o entre un líquido y un sólido. Un "biotensoactivo" es una sustancia tensoactiva producida por una célula viva.

El término de transición "que comprende", que es sinónimo de "que incluye" o "que contiene", es inclusivo o abierto y no excluye elementos o pasos de método adicionales no citados. Por el contrario, la frase transitoria "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase transitoria "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados "y aquellos que no afectan

materialmente a las características básicas y novedosas" de la invención reivindicada. El uso del término "que comprende" contempla otras realizaciones que "consisten" o "consisten esencialmente" en los componentes enumerados.

5 A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en el presente documento, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en este documento, los términos "un", "una", "uno", "y", "el" y "la" se entienden en singular o plural.

10 A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un rango de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% ó 0.01% del valor establecido.

15 La enumeración de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en este documento incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo individual o combinación de grupos enumerados. La enumeración de una realización para una variable o aspecto en este documento incluye esa realización como una realización única o en combinación con cualquier otra realización o porciones de la misma.

Cualquier composición o método proporcionado en este documento puede combinarse con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en este documento.

20 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma y de las reivindicaciones. Todas las referencias citadas en este documento se incorporan aquí como referencia.

Métodos de co-cultivo

25 La presente invención proporciona materiales y métodos para la producción de biomasa (por ejemplo, material celular viable o inactivo), metabolitos extracelulares y/o componentes intracelulares. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona métodos mejorados para producir uno o más subproductos del crecimiento microbiano, en los que los métodos comprenden co-cultivar dos o más microorganismos diferentes en un reactor de fermentación.

30 De manera favorable, la biomasa celular total y/o la producción total de uno o más subproductos del crecimiento lograda cuando se utilizan los métodos de co-cultivo de la presente invención pueden ser mayores en comparación con los cultivos de los microbios individuales cuando se cultivan por separado.

35 Más específicamente, en realizaciones preferidas, la presente invención proporciona métodos para mejorar la producción de uno o más subproductos del crecimiento microbiano, comprendiendo

los métodos co-cultivar un primer microorganismo y un segundo microorganismo en un reactor de fermentación sumergido en condiciones favorables para el crecimiento y producción de uno o más subproductos del crecimiento. En determinadas formas de realización, el primer microorganismo es una mixobacteria. y el segundo microorganismo es una cepa de *Pseudomonas*.

5 Los microorganismos pueden co-cultivarse utilizando sistemas de cultivo que van desde pequeña a gran escala. Estos sistemas de cultivo pueden incluir, pero no se limitan a, cultivo/fermentación sumergida, fermentación en estado sólido (SSF) e híbridos, modificaciones y/o combinaciones de los mismos.

10 En ciertas realizaciones preferidas, los métodos para co-cultivar microorganismos y/o para producir subproductos del crecimiento microbiano comprenden: inocular un sistema de fermentación que comprende un medio nutritivo líquido con un primer microorganismo e inocular el sistema de fermentación con un segundo microorganismo, en donde el primer microorganismo es una bacteria *Myxococcus* spp. y el segundo microorganismo es una cepa de *Pseudomonas* spp. Incluso más preferiblemente, en una realización, el *Myxococcus* es *M. xanthus* y la *Pseudomonas* es una cepa de *P. chlororaphis*. Preferiblemente, la cepa no es patógena para humanos y/o animales.

15 En una realización, la cepa de *P. chlororaphis* es *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* “Cepa 306” (Colección Ucraniana de Microorganismos (UCM) número de depósito UCM B-306 (IMV B-7096), no. 2687).

20 En una realización, la cepa de *P. chlororaphis* es *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* “Cepa 111” (número de depósito UCM UCM B-111 (IMV B-7097), nº 2116).

25 En determinadas realizaciones, el método de co-cultivo utiliza fermentación sumergida. En determinadas realizaciones, se usa un híbrido de fermentación sumergida y en estado sólido, en el que un vehículo de anclaje particulado se suspende en el medio de cultivo líquido para que sirva como un sitio para la unión celular y/o la formación de biopelículas. Esto es particularmente útil para el crecimiento de mixobacterias, que pueden exhibir un crecimiento mejorado sobre una superficie sólida u otro vehículo.

30 El recipiente de crecimiento de microbios utilizado según la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivo para uso industrial. En una realización, el recipiente puede tener controles/sensores funcionales o puede estar conectado a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de co-cultivo, tales como pH, oxígeno, presión, temperatura, potencia del eje del agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de metabolitos.

35 En una realización adicional, el recipiente también puede controlar el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, medición del número de células y las fases de crecimiento). Alternativamente, se pueden tomar muestras en cualquier punto durante la fermentación

para realizar, por ejemplo, mediciones de recuento y/o pureza de UFC. En una realización, el muestreo se realiza al comienzo de la fermentación y varias veces al día (por ejemplo, dos veces al día) durante la fermentación.

5 En algunas realizaciones, el método de cultivo utiliza un cultivo de alimentación por lotes. El reactor de fermentación se puede alimentar, por ejemplo, con aceite de canola (u otra solución antiespumante/despumante), fuentes de carbono (por ejemplo, glicerol), ajustadores de pH y/u otras fuentes de nutrientes adicionales según sea necesario.

10 En una realización, el reactor de fermentación está conectado a un recipiente de alimentación. El recipiente de alimento contiene preferiblemente medio nutritivo líquido y/o las otras sustancias para alimentar (por ejemplo, transferir o complementar) al reactor de fermentación. La "alimentación" del reactor de fermentación puede ocurrir de forma continua o en puntos de tiempo designados durante todo el cultivo.

15 En ciertas realizaciones, los puntos de tiempo de alimentación designados son aproximadamente 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas ó 52 horas después del inicio del cultivo. En ciertas realizaciones, existen múltiples puntos de tiempo en los que el medio nutritivo y/u otras sustancias de alimentación se alimentan al reactor, por ejemplo, cada 6 horas, cada 12 horas, cada 24 horas, cada 36 horas o cada 48 horas durante todo el proceso de cultivo.

20 En una realización, el reactor de fermentación está conectado a un recipiente de recogida de espuma. A pesar del uso de una solución antiespumante/despumante en el medio nutritivo y/o en la alimentación, todavía se producen de forma natural algunas cantidades de espuma mediante el proceso de fermentación. En algunas realizaciones, la espuma se extrae automática y/o manualmente del reactor y se recoge en el recipiente de recogida de espuma. En algunas realizaciones, la espuma recogida comprende subproductos del crecimiento microbiano, tales como biotensioactivos, que se pueden extraer y, opcionalmente, purificar.

25 En una realización, el medio nutritivo líquido comprende una fuente de carbono. La fuente de carbono puede ser un carbohidrato, como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y/o maltosa; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico y/o ácido pirúvico; alcoholes como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; grasas y aceites tales como aceite de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de canola y/o aceite de linaza; melazas en polvo, etc. Estas fuentes de carbono se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

30

En una realización, el medio nutritivo líquido comprende una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato

de amonio, amoniaco, urea y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En una realización, también se pueden incluir una o más sales inorgánicas en el medio nutritivo líquido. Las sales inorgánicas pueden incluir, por ejemplo, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de monopotasio, hidrogenofosfato dipotásico, hidrogenofosfato de disodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro (ferroso), cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio, nitrato de calcio, sulfato de magnesio, fosfato de sodio, cloruro de sodio y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas se pueden usar de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En una realización, se incluyen en el medio factores de crecimiento y nutrientes traza para microorganismos. Esto es particularmente preferido cuando se cultivan microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que necesitan. También se pueden incluir en el medio nutrientes inorgánicos, incluidos oligoelementos como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto. Además, se pueden incluir fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales, proteínas y microelementos, por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de patata, extracto de carne, extracto de soja, extracto de cáscara de plátano y similares, o en formas purificadas. También se pueden incluir aminoácidos tales como, por ejemplo, los útiles para la biosíntesis de proteínas.

En algunas realizaciones, el vehículo de anclaje particulado se suspende en el medio de cultivo líquido antes, al mismo tiempo o después de que el medio de cultivo líquido se inocula con el primer y/o segundo microorganismo.

El vehículo de anclaje particulado puede ser cualquier material adecuado para servir como sitio de nucleación para la unión y el crecimiento bacteriano. En algunas realizaciones, el material comprende una pluralidad de piezas, partículas y/o granos individuales, que son de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente: 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm ó 0.5 mm de diámetro. Las bacterias se adhieren a las piezas y se acumulan sobre ellas, produciendo masas portadoras de bacterias.

El vehículo de anclaje puede ser inerte o puede transportar y/o comprender nutrientes adicionales y/o inoculante microbiano. En determinadas formas de realización, el vehículo de anclaje puede ser poroso. El vehículo de anclaje puede comprender materiales sintéticos y/o materiales de origen natural.

En una realización, el vehículo de anclaje comprende perlas de alginato de sodio. Las perlas se pueden preparar, por ejemplo, añadiendo continuamente una solución que comprende del 1 al 5%, o del 2 al 3% de alginato de sodio aséptico y, opcionalmente, nutrientes y/o inoculante bacteriano, en un 1 a 7% estéril, ó 2 a 5% de solución de cloruro de calcio para formar perlas.

En una realización, el vehículo de anclaje puede comprender esferas hechas de, por ejemplo, vidrio, un polímero (por ejemplo, ácido poliláctico (PLA)), agar o gelatina. En una realización, el vehículo de anclaje puede ser trozos de, por ejemplo, una esponja picada o una esponja. En una realización, el vehículo de anclaje puede comprender productos alimenticios, por ejemplo, semillas, nueces, frijoles o incluso trozos de fruta picada, como plátanos.

En realizaciones preferidas, el vehículo de anclaje comprende granos finos de celulosa y/o harina de maíz. En una realización, se prefiere el uso de granos finos sobre partículas más grandes (por ejemplo, más de 5 mm), porque facilita el escalamiento del proceso.

De manera ventajosa, el uso del vehículo de anclaje proporciona una mayor producción de biomasa bacteriana debido, por ejemplo, a la mayor superficie específica a la que las bacterias pueden adherirse y acumularse. Además, la acumulación de biomasa bacteriana puede conducir a aumentos en la producción de subproductos de crecimiento benéficos, como los biotensoactivos.

En una realización, las bacterias crecen en forma de biopelícula sobre el vehículo de anclaje. En una realización, algunas bacterias crecen en el medio de cultivo líquido en forma planctónica y algunas bacterias crecen en el vehículo de anclaje.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo líquido se inocula con los microorganismos antes o simultáneamente con la suspensión del vehículo de anclaje. En algunas realizaciones, el vehículo de anclaje se inocula previamente con el primer y/o segundo microorganismo antes de suspenderse en el medio de cultivo líquido.

El método de co-cultivo puede proporcionar además oxigenación al cultivo en crecimiento. Una realización utiliza el movimiento lento del aire para eliminar el aire que contiene poco oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado puede ser aire ambiental suplementado diariamente a través de mecanismos que incluyen impulsores para la agitación mecánica del líquido y rociadores de aire para suministrar burbujas de gas al líquido para la disolución del oxígeno en el líquido. En ciertas realizaciones, los niveles de oxígeno disuelto (OD) se mantienen en aproximadamente un 25% a aproximadamente un 75%, aproximadamente un 30% a aproximadamente un 70%, aproximadamente un 35% a aproximadamente un 65%, aproximadamente un 40% a aproximadamente un 60% o aproximadamente un 50% de saturación de aire. El flujo de aire se puede suministrar, por ejemplo, a aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.0 v/m, o aproximadamente a 1.0 a aproximadamente 1.5 vvm.

En algunas realizaciones, el método de co-cultivo puede comprender además añadir ácidos y/o antimicrobianos en el medio líquido antes y/o durante el proceso de co-cultivo para protegerlo de la contaminación.

En una realización, antes de la inoculación, los componentes del medio de cultivo líquido se pueden esterilizar opcionalmente. Si se usa, el vehículo de anclaje también se esteriliza

preferiblemente, por ejemplo, usando una autoclave u otro método conocido en la técnica. Además, el agua utilizada para preparar el medio se puede filtrar para evitar la contaminación.

En una realización, la esterilización del medio nutritivo líquido se puede lograr colocando los componentes del medio de cultivo líquido en agua a una temperatura de aproximadamente 85-100 °C.

- 5 En una realización, la esterilización se puede lograr disolviendo los componentes en peróxido de hidrógeno del 1 al 3% en una proporción de 1: 3 (p/v).

En una realización, el equipo usado para el co-cultivo es estéril. El equipo de cultivo, como el reactor/recipiente, puede separarse de una unidad de esterilización, por ejemplo, una autoclave, pero conectarse a ella. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza *en el lugar* antes de iniciar la inoculación. El aire se puede esterilizar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el aire del ambiente puede pasar a través de al menos un filtro antes de introducirse en el recipiente. En otras formas de realización, el medio se puede pasteurizar u, opcionalmente, no se puede añadir calor en absoluto, donde se puede aprovechar el uso del pH y/o la baja actividad del agua para controlar el crecimiento microbiano no deseado.

15 El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. En algunas realizaciones, el pH es de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 11.0, de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 10.0, de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0, de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 8.0 o de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.0. En una realización, el pH es de aproximadamente 6.8. Pueden usarse tampones y reguladores de pH, tales como carbonatos y fosfatos, para estabilizar el pH cerca de un valor preferido. En ciertas realizaciones, se incluye una solución básica (por ejemplo, 15 a 25% o solución de NaOH al 20%) en el medio nutritivo líquido y/o se alimenta al reactor durante el cultivo para mantener y/o ajustar automáticamente el pH del cultivo. Cuando los iones metálicos están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio líquido.

25 En una realización, el método para el co-cultivo de microorganismos se lleva a cabo entre aproximadamente 5 °C a aproximadamente 100 °C, aproximadamente 15 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, o aproximadamente 24 °C a aproximadamente 30 °C. En una realización, el co-cultivo se puede llevar a cabo de forma continua a una temperatura constante. En otra realización, el co-cultivo puede estar sujeto a cambios de temperatura.

30 Según los métodos de la presente invención, el primer y segundo microorganismo se pueden incubar en el sistema de fermentación durante un período de tiempo suficiente para lograr un efecto deseado, por ejemplo, producción de una cantidad deseada de biomasa celular o una cantidad deseada de uno o más subproductos del crecimiento microbiano. El contenido de biomasa puede ser, por ejemplo, de 5 g/L a 180 g/L o más, o de 10 g/L a 150 g/L.

En algunas realizaciones, la fermentación se produce durante 24 horas a 1 semana, aproximadamente de 4 a 6 días o aproximadamente 5 días. El (los) subproducto (s) del crecimiento microbiano producido por los microorganismos puede retenerse en los microorganismos o secretarse al medio de crecimiento. En determinadas realizaciones, el subproducto del crecimiento se produce en forma de una capa de espuma en la parte superior del cultivo.

En otra realización, el método para producir subproductos del crecimiento microbiano puede comprender además las etapas de extraer, concentrar y/o purificar el subproducto del crecimiento microbiano de interés. Alternativamente, los subproductos del crecimiento microbiano se pueden utilizar en su forma cruda, lo que significa que no se realiza ninguna purificación. En una realización adicional, el medio de crecimiento puede contener compuestos que estabilicen la actividad del subproducto del crecimiento microbiano.

Los métodos se pueden realizar en un proceso discontinuo, cuasi-continuo, continuo o en un proceso de alimentación discontinua.

En una realización, toda la espuma, el medio nutritivo, las células y/o las masas portadoras de bacterias se eliminan tras la finalización del co-cultivo (por ejemplo, tras conseguir, por ejemplo, una densidad celular o cantidad de metabolito deseada). La masa celular restante se puede reciclar y/o hidrolizar para obtener los compuestos sobrantes presentes en las células. En este procedimiento por lotes, se inicia un lote completamente nuevo tras la recolección del primer lote.

En una realización, el proceso es un proceso de alimentación por lotes, en el que ciertas fuentes de nutrientes y/u otras sustancias se introducen en el reactor en determinados momentos para reponer el medio nutritivo y/o aumentar la eficiencia del proceso. El lote completo se cosecha al final del ciclo de cultivo y se inicia un lote completamente nuevo tras la cosecha del primer lote.

En una realización, el proceso es continuo o cuasi-continuo, donde los subproductos del crecimiento de interés se recogen del cultivo, por ejemplo, de la espuma que se forma durante el co-cultivo y/o del medio nutritivo líquido. En realizaciones preferidas, la espuma y/o el medio se colocan en un recipiente de recogida con un medidor de pH opcional. La biomasa y/o los vehículos de anclaje inoculados con células viables permanecen en el reactor de fermentación como inoculante y el medio nutritivo se repone, por ejemplo, desde un tanque de alimentación que aloja medio nutritivo fresco, para continuar el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos.

En una realización, la espuma se puede extraer de forma constante, es decir, cada 1 a 24 horas, cada dos días o cada 2 a 7 días. En otra realización, la espuma se puede extraer al alcanzar un cierto volumen. La composición que se elimina puede ser una espuma o un caldo sin células y/o puede contener algunas células.

La espuma y/o el caldo que se recolecta del sistema de cultivo se pueden procesar lavando y/o centrifugando para extraer los subproductos del crecimiento microbiano. Opcionalmente, los

subproductos del crecimiento pueden almacenarse, purificarse y/o usarse directamente en forma cruda.

En una realización, algunos o todos los vehículos de anclaje, si se usan, pueden recogerse del cultivo y lavarse usando un disolvente, por ejemplo, etanol de baja concentración (por ejemplo, 1 a 2%). A continuación, el líquido resultante se centrifuga para separar los subproductos del crecimiento y la masa celular.

De manera favorable, la biomasa celular total y/o la producción total de uno o más subproductos de crecimiento lograda cuando se utilizan los métodos de co-cultivo de la presente invención puede ser mayor en comparación con los cultivos puros de los microbios individuales cuando se cultivan por sí mismos.

En determinadas realizaciones, la biomasa celular total conseguida según los métodos en cuestión, es al menos 0.01%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más, más que cuando el primer y segundo microorganismo se cultivan individualmente.

En ciertas realizaciones, la concentración total de un subproducto del crecimiento producido de acuerdo con los métodos de la presente invención es al menos 0.01%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70 %, 80%, 90%, 100% o más, mayor que cuando el primer y segundo microorganismo se cultivan individualmente.

Microorganismos

Los microorganismos cultivados según los sistemas y métodos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, bacterias, levaduras y/u hongos. Estos microorganismos pueden ser microorganismos naturales o modificados genéticamente. Por ejemplo, los microorganismos pueden transformarse con genes específicos para exhibir características específicas. Los microorganismos también pueden ser mutantes de una cepa deseada. Como se usa en el presente documento, "mutante" significa una cepa, variante genética o subtipo de un microorganismo de referencia, en el que la mutante tiene una o más variaciones genéticas (por ejemplo, una mutación puntual, mutación con cambio de sentido, mutación sin sentido, delección, duplicación, mutación por desplazamiento de marco o expansión repetida) en comparación con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para preparar mutantes son bien conocidos en la técnica microbiológica. Por ejemplo, la mutagénesis UV y la nitrosoguanidina se utilizan ampliamente con este fin.

En realizaciones preferidas, los microorganismos son bacterias, incluidas bacterias Gram positivas y Gram negativas. En realizaciones específicas, el primer microorganismo se selecciona de mixobacterias. Las mixobacterias son bacterias depredadoras formadoras de limo que viven en grupos o enjambres. Estos enjambres pueden formar biopelículas complejas, así como estructuras corporales fructíferas, que son agregados simples o ramificados que contienen mixosporas. Durante la

depredación, las bacterias secretan moléculas depredadoras, que incluyen enzimas, antibióticos y otros metabolitos secundarios, que pueden incluir, por ejemplo, biotensoactivos.

Las mixobacterias incluyen, por ejemplo, *Myxococcus* spp., *Stigmatella aurantiaca*, *Sorangium cellulosum*, *Minicystis rosea*, y *Chondromyces crocatus*.

5 En realizaciones preferidas, las mixobacterias es un *Myxococcus* spp. bacteria seleccionada de, por ejemplo, *M. xanthus*, *M. fulvus*, *M. flavescens*, *M. macrosporus*, *M. stipitatus*, *M. virescens*, *M. coralloides*, y *M. disciformis*. Aún más preferiblemente, el *Myxococcus* es *M. xanthus*.

En ciertas realizaciones, el segundo microorganismo se selecciona de bacteria *Pseudomonas* spp. Preferiblemente, el *Pseudomonas* es una cepa que no es patógena para humanos o animales.

10 El género *Pseudomonas* comprende bacterias Gram-negativas que normalmente crecen en condiciones aeróbicas. Algunos son patógenos para los seres humanos (p. ej., *P. aeruginosa*) o plantas (p. ej., *P. putida*), mientras que otros pueden promover el crecimiento de las plantas (p. ej., *P. fluorescens*). La mayoría de las pseudomonas forman biopelículas, lo que las hace especialmente resistentes a los antibióticos y difíciles de tratar en caso de infección; sin embargo, muchas
15 *Pseudomonas* spp. son capaces de producir subproductos de crecimiento útiles, incluidos, por ejemplo, biotensoactivos.

En una realización, la cepa de *P. chlororaphis* es *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* “cepa 306” (Colección Ucraniana de Microorganismos (UCM por sus siglas en inglés) número de depósito UCM B-306 (IMV B-7096), no. 2687). En una realización, la cepa de *P. chlororaphis* es *P.*
20 *chlororaphis* subsp. *aureofaciens* “Cepa 111” (número de depósito UCM UCM B-111 (IMV B-7097), no. 2116).

En determinadas realizaciones, se incluyen uno o más microorganismos adicionales, además del primer y segundo microorganismos. En algunas realizaciones, los microorganismos adicionales son una cepa de *Pseudomonas* distinto del que se utiliza como segundo microorganismo. Por ejemplo,
25 en algunas realizaciones, la cepa 306 y la cepa 111 se cultivan conjuntamente con el primer microorganismo.

En realizaciones preferidas, *M. xanthus* y una cepa de *P. chlororaphis* se cultivan conjuntamente de acuerdo con los métodos objeto. Ventajosamente, en algunas realizaciones, la biomasa celular del co-cultivo de estas dos cepas es mayor que cuando se cultivan cultivos puros de
30 los microbios individuales. Además, en algunas realizaciones, la producción de biotensoactivos y/u otros metabolitos en co-cultivo es mayor que cuando se utilizan cultivos puros de los microbios individuales.

En determinadas realizaciones, esta producción mejorada de subproductos del crecimiento y/o metabolitos es causada por el co-cultivo, en donde la presencia de un microorganismo competidor
35 induce una producción mejorada de, por ejemplo, moléculas defensivas y/o promotores del

autocrecimiento. En determinadas formas de realización, estos son biotensoactivos y/o terpenos/terpenoides.

Subproductos del crecimiento microbiano

Los métodos y sistemas de la presente invención pueden usarse para producir composiciones que comprenden uno o más subproductos útiles del crecimiento microbiano.

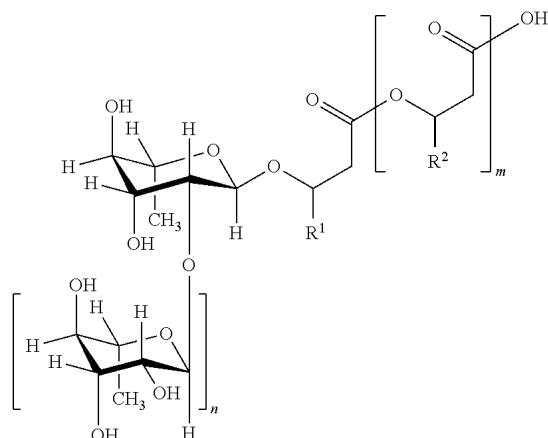
En una realización preferida, los subproductos del crecimiento son uno o más biotensoactivos. Los biotensoactivos según la presente invención pueden incluir, por ejemplo, glicolípidos, lipopéptidos, flavolípidos, fosfolípidos, ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos, lipoproteínas, complejos de lipopolisacárido-proteína y/o complejos de polisacárido-proteína-ácido graso.

En realizaciones específicas, el uno o más biotensoactivos son ramnolípidos (RLP) o biotensoactivos de glicolípidos similares. Los ramnolípidos comprenden un resto de grupo de cabeza de glicosilo (es decir, una ramnosa) y una cola de ácido graso de ácido 3-(hidroxialcanoiloxi) alcanoico (HAA), tal como, por ejemplo, ácido 3-hidroxidocanoico. Existen dos clases principales de ramnolípidos, mono y di-ramnolípidos, que comprenden uno o dos restos ramnosa, respectivamente. El resto de HAA puede variar en longitud y grado de ramificación, dependiendo de, por ejemplo, el medio de crecimiento y las condiciones ambientales.

En algunas realizaciones, el biotensoactivo es un ramnolípidos (RLP) o biotensoactivos glicolípidos similares. Los ramnolípidos comprenden un resto de grupo de cabeza de glicosilo (es decir, una ramnosa) y una cola de ácido graso de ácido 3-(hidroxialcanoiloxi) alcanoico (HAA), tal como, por ejemplo, ácido 3-hidroxidocanoico. Existen dos clases principales de ramnolípidos, mono y di-ramnolípidos, que comprenden uno o dos restos ramnosa, respectivamente. El resto de HAA puede variar en longitud y grado de ramificación, dependiendo de, por ejemplo, el medio de crecimiento y las condiciones ambientales.

En determinadas realizaciones, el RLP tiene una estructura general de acuerdo con la Estructura General (1):

(1)



donde m es 2, 1 o 0,

n es 1 o 0,

R¹ y R² son, independientemente entre sí, un grupo funcional orgánico igual o diferente con 2 a 24, preferiblemente de 5 a 13 átomos de carbono, en particular un grupo funcional alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, que también puede ser insaturado,

en donde el grupo funcional alquilo es un grupo funcional alquilo saturado lineal que tiene de 8 a 12 átomos de carbono, o es un grupo funcional nonilo o decilo o una mezcla de los mismos.

Las sales de estos compuestos también se incluyen según la invención. En la presente invención, se entiende por "di-ramnolípido" los compuestos de la fórmula anterior o sus sales en las que n es 1. Por lo tanto, se entiende en la presente invención por "monoramnolípido" los compuestos de fórmula general o las sales de los mismos en los que n es 0.

En determinadas realizaciones, los métodos pueden usarse para producir de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30 g/L, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 g/L, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 g/L de RLP y/o glicolípidos similares a RLP.

En algunas realizaciones, los microorganismos también pueden producir uno o más tipos adicionales de biotensoactivos, tales como otros glicolípidos (por ejemplo, soforolípidos, lípidos de trehalosa, lípidos de celobiosa y/o lípidos de manosileritritol) y/o flavolípidos. Los flavolípidos son producidos típicamente por bacterias del género *Flavobacterium*. El resto hidrofílico comprende ácido cítrico y dos moléculas de cadaverina. El resto hidrófobo está compuesto por dos grupos acilo de cadena ramificada que varían de 6 a 10 carbonos.

En ciertas realizaciones, los métodos se pueden usar para producir alrededor de 0.1 a alrededor de 30 g/L alrededor de 1 a alrededor de 25 g/L, o alrededor de 5 a alrededor de 25 g/L de uno o más tipos de biotensoactivos, por ejemplo, flavolípidos.

En algunas realizaciones, los subproductos del crecimiento microbiano incluyen otros metabolitos. Como se usa en este documento, un "metabolito" se refiere a cualquier sustancia

producida por el metabolismo (por ejemplo, un subproducto del crecimiento), o una sustancia necesaria para participar en un proceso metabólico particular, por ejemplo, enzimas, inhibidores de enzimas, biopolímeros, ácidos, disolventes, gases, proteínas, péptidos, aminoácidos, alcoholes, pigmentos, policétidos, feromonas, hormonas, lípidos, ectotoxinas, endotoxinas, exotoxinas, carbohidratos, antibióticos, antifúngicos, antivirales y/u otros compuestos orgánicos y/o bioactivos. El contenido de metabolitos producido por el método puede ser, por ejemplo, al menos 0.1%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%.

En determinadas realizaciones, el uno o más subproductos del crecimiento incluyen compuestos orgánicos, tales como terpenos y/o terpenoides. Los terpenos y terpenoides (isoprenoides) son compuestos de hidrocarburos que suelen producir las plantas y algunos insectos. Debido a la tasa de crecimiento de las plantas productoras de terpenos/terpenoides, como las coníferas y el cannibus, la producción en masa de terpenos y terpenoides también puede ser muy lenta y antieconómica. En algunas realizaciones, los microorganismos cultivados según la presente invención producen terpenos y/o terpenoides.

Los tipos de terpenos pueden incluir, por ejemplo, hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, sesquaraterpenos, tetraterpenos, politerpenos y/o norisoprenoides. Los terpenoides son terpenos modificados. Los tipos de terpenoides pueden incluir, por ejemplo, hemiterpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides y/o politerpenoides. Los ejemplos específicos no limitantes de terpenos y/o terpenoides incluyen caroteno, carotenoides, mirceno, limoneno, linalol, pineno, cariofileno, bisabolol, citral, mentol, alcanfor, salvinorina A, cannabinoides, ginkgolida, bilobalida y curcuminoides. En una realización, el compuesto orgánico es un carotenoide.

En ciertas realizaciones, el uno o más subproductos del crecimiento incluyen enzimas tales como, por ejemplo, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y/o ligasas. Los tipos y/o subclases específicos de enzimas de acuerdo con la presente invención también pueden incluir, pero no se limitan a, nitrogenasas, proteasas, amilasas, glicosidasas, celulasas, glucosidasas, glucanasas, galactosidasas, mannosidasas, sucrasas, dextranasas, hidrolasas, metiltransferasas, fosforilasas, deshidrogenasas (p. ej., glucosa deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa), oxigenasas (p. ej., alcano oxigenasas, metano monooxigenasas, dioxigenasas), hidroxilasas (p. ej., alcano hidroxilasa), esterasas, lipasas, ligninasas, mananasas, oxidasas, lacasasas, tirosasas enzimas del citocromo P450, peroxidasas (p. ej., cloroperoxidasa y otras haloperoxidasas) y lactasas.

En determinadas realizaciones, el uno o más subproductos del crecimiento incluyen compuestos antibióticos, tales como, por ejemplo, aminoglucósidos, amilociclicina, bacitracina, bacillaene, bacilisina, bacilisocina, coralopirironina A, difficidina, etnangien gramicidina, β -lactámicos, licheniformin, macrolactinsublancin, oxidifficidin, plantazolicin, ripostatina,

espectinomicina, subtilina, tirocidina y/o zwittermicina A. En algunas realizaciones, un antibiótico también puede ser un tipo de biotensoactivo.

En determinadas realizaciones, el uno o más subproductos del crecimiento incluyen compuestos antifúngicos, tales como, por ejemplo, fengycina, surfactina, haliangicina, micobacilina, micosubtilina y/o bacilomicina. En algunas realizaciones, un antifúngico también puede ser un tipo de biotensoactivo.

En determinadas realizaciones, el uno o más subproductos del crecimiento incluyen otros compuestos bioactivos, tales como, por ejemplo, butanol, etanol, acetato, acetato de etilo, lactato, acetoína, ácido benzoico, 2,3-butanodiol, beta-glucano, ácido indol-3-acético (IAA por sus siglas en inglés), lovastatina, auraquina, kanosamina, reseoflavina, terpentecina, pentalenolactona, thuringiensina (β -exotoxina), policétidos (PK), terpenos, terpenoides, fenilpropanoides, alcaloides, sideróforos, así como péptidos sintetizados ribosómicamente y no ribosómicamente, para nombrar unos pocos.

Productos a base de microbios

La presente invención proporciona productos basados en microbios, así como su uso en una variedad de aplicaciones, que incluyen, por ejemplo, agricultura, recuperación mejorada de aceite, biorremediación, productos farmacéuticos y cosméticos.

Un producto basado en microbios de la presente invención es simplemente el medio de fermentación que contiene los microorganismos, los subproductos del crecimiento microbiano producidos por los microorganismos, cualquier nutriente residual y/o vehículo de anclaje particulado residuales. El producto a base de microbios puede usarse con o sin extracción y/o purificación.

Los microorganismos pueden estar en forma activa o inactiva, o en forma de células vegetativas, biopelículas, esporas o una combinación de los mismos. Los productos a base de microbios pueden usarse sin mayor estabilización, conservación y almacenamiento. Ventajosamente, el uso directo de estos productos basados en microbios conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos indeseables y mantiene la actividad de los subproductos del crecimiento microbiano.

En una realización, el primer y segundo microorganismos se separan entre sí después del cultivo. En una realización, el producto comprende una mezcla del primer y segundo microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento.

En una realización, la composición no comprende microorganismos vivos. En una realización, la composición no comprende microorganismos en absoluto, ya sean vivos o inactivos.

En una realización, la composición comprende uno o más subproductos del crecimiento microbiano separados del microorganismo que los produjo. Los subproductos del crecimiento pueden estar en forma purificada o sin purificar.

Los microorganismos, el medio nutritivo y/o la espuma que resultan del crecimiento microbiano pueden retirarse del fermentador y/o recipiente de recogida y transferirse, por ejemplo, a través de tuberías para su uso inmediato.

En otras realizaciones, la composición (microbios, espuma y/o caldo) se puede colocar en recipientes de tamaño apropiado, teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del tanque de fermentación y cualquier modo de transporte desde la instalación de crecimiento de microbios hasta el lugar de uso. Por tanto, los recipientes en los que se coloca la composición a base de microbios pueden ser, por ejemplo, de 0.0038 m³ (1 galón) a 3.78 m³ (1000) galones o más. En determinadas formas de realización, los recipientes son de 0.0076 m³ (2 galones), 0.0189 (5 galones), 0.0946 (25 galones) o más.

Tras recolectar la composición basada en microbios de los recipientes de crecimiento, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto recolectado se coloca en contenedores y/o se canaliza (o se transporta de otro modo para su uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, tampones, vehículos, otras composiciones a base de microbios producidas en la misma o diferente instalación, modificadores de la viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento de microbios, agentes de rastreo, pesticidas y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto basado en microbios puede comprender caldo en donde 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, del 0% al 100%, del 10% al 90%, del 20% al 80% o del 30% al 70%, incluidos todos los porcentajes entre ellos.

Opcionalmente, el producto se puede almacenar antes de su uso. Preferiblemente, el tiempo de almacenamiento es corto. Por lo tanto, el tiempo de almacenamiento puede ser inferior a 60 días, 45 días, 30 días, 20 días, 15 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día o 12 horas. En una realización preferida, el producto se almacena a o por debajo de una temperatura como, por ejemplo, 20°C, 15°C, 10°C, 5°C o 4°C, o menos. Si hay células presentes y en forma de esporas, el producto, en una realización, se almacena y transporta a baja temperatura, no superior a 15 °C, para evitar la germinación prematura.

30 *Métodos de uso*

Los productos basados en microbios de la presente invención se pueden usar para una variedad de propósitos. En una realización, la composición se puede utilizar en agricultura. Por ejemplo, se proporcionan métodos en los que una composición producida según la presente invención se aplica a una planta y/o su entorno para tratar y/o prevenir la propagación de plagas y/o enfermedades. La composición también puede ser útil para mejorar la dispersión y absorción de agua

en el suelo, así como para mejorar la absorción de nutrientes del suelo a través de las raíces de las plantas, facilitar la salud de las plantas, aumentar los rendimientos y gestionar la aireación del suelo.

En una realización, las composiciones objeto pueden ser muy ventajosas en el contexto de la industria del petróleo y el gas. Cuando se aplican a un pozo de petróleo, un pozo, una formación subterránea o un equipo usado para la recuperación de petróleo y/o gas, las composiciones producidas de acuerdo con la presente invención pueden usarse en métodos para mejorar la recuperación de petróleo crudo; reducción de la viscosidad del aceite; eliminación y dispersión de parafina de varillas, tubos, revestimientos y bombas; prevención de la corrosión del equipo; recuperación de petróleo de arenas petrolíferas y pozos de extracción; mejora de las operaciones de fracturación hidráulica como fluidos de fracturación; reducción de concentración de H_2S en formaciones y petróleo crudo; y limpieza de tanques, líneas de flujo y tuberías.

En una realización, las composiciones producidas según la presente invención pueden usarse para mejorar una o más propiedades del aceite. Por ejemplo, se proporcionan métodos en los que la composición se aplica al aceite o a una formación que contiene aceite para reducir la viscosidad del aceite, convertir el aceite de ácido a dulce y/o mejorar el aceite de crudo pesado a fracciones más ligeras.

En una realización, las composiciones producidas según la presente invención pueden usarse para limpiar equipos industriales. Por ejemplo, se proporcionan métodos en los que se aplica una composición a un equipo de producción de petróleo tal como una varilla de pozo de petróleo, tubería y/o revestimiento, para eliminar hidrocarburos pesados, parafinas, asfaltenos, incrustaciones y otros contaminantes del equipo. La composición también se puede aplicar a equipos utilizados en otras industrias, por ejemplo, procesamiento y preparación de alimentos, agricultura, molienda de papel y otros donde las grasas, aceites y grasas se acumulan y contaminan y/o ensucian el equipo.

En una realización, las composiciones producidas según la presente invención pueden usarse para mejorar la salud animal. Por ejemplo, se proporcionan métodos en los que la composición se puede aplicar al pienso o al agua de los animales, o se puede mezclar con el pienso o el agua, y se puede utilizar para prevenir la propagación de enfermedades en las operaciones de ganadería y acuicultura, reducir la necesidad del uso de antibióticos en grandes cantidades, reducir las emisiones de metano, dióxido de carbono y/o óxido nitroso, así como proporcionar proteínas suplementarias y otros nutrientes.

En una realización, las composiciones producidas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para prevenir el deterioro de los alimentos, prolongar la vida consumible de los alimentos y/o prevenir enfermedades transmitidas por los alimentos. Por ejemplo, se proporcionan métodos en los que la composición se aplica a un producto alimenticio, como productos frescos, productos horneados, carnes y cereales postcosecha, para evitar el crecimiento microbiano indeseable.

Otros usos de las presentes composiciones incluyen, entre otros, biofertilizantes, biopesticidas, biolixiviación, biorremediación de suelo y agua, adyuvantes farmacéuticos (para aumentar la biodisponibilidad de fármacos ingeridos por vía oral), productos cosméticos, control del crecimiento microbiano no deseado y muchos otros.

5

Producción local de productos a base de microbios

En realizaciones preferidas de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbios produce microorganismos frescos de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés en una escala deseada. La instalación de crecimiento de microbios puede estar
10 ubicada en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones a base de microbios de alta densidad en cultivo discontinuo, cuasi-continuo o continuo.

Las instalaciones de crecimiento de microbios distribuidos se pueden ubicar en el lugar donde se utilizará el producto a base de microbios. Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbios puede estar a menos de 482803, 402336, 321869, 241402, 160934, 120701, 80467.2, 40233.6,
15 24140.2, 16093.4, 8046.72, 4828.03 o 1609.34 m (300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 milla) del lugar de uso.

Las instalaciones de crecimiento de microbios de la presente invención producen composiciones frescas basadas en microbios, que comprenden los propios microbios, metabolitos microbianos y/u otros componentes del caldo en donde crecen los microbios. Si se desea, las
20 composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas o propágulos, o una mezcla de células vegetativas y propágulos.

Debido a que el producto a base de microbios se genera localmente, sin recurrir a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismos de la producción microbiana convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de células bacterianas y/o
25 propágulos, lo que requiere un volumen menor del producto a base de microbios para su uso en la aplicación en el sitio o que permite aplicaciones microbianas de densidad mucho más alta donde sea necesario para lograr la eficacia deseada. Esto permite un biorreactor reducido (por ejemplo, un tanque de fermentación más pequeño y suministros más pequeños de material de arranque, nutrientes, agentes de control del pH), lo que hace que el sistema sea eficiente. La generación local del producto
30 a base de microbios también facilita la inclusión del caldo de crecimiento en el producto. El caldo puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente adecuados para uso local.

De manera ventajosa, las composiciones se pueden adaptar para su uso en un lugar específico. Las instalaciones de crecimiento de microbios brindan versatilidad de fabricación mediante la
35 capacidad de adaptar los productos basados en microbios para mejorar las sinergias con las geografías

de destino y aprovechar el poder de los microorganismos locales naturales y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción de petróleo. Los microbios locales se pueden identificar basándose, por ejemplo, en la tolerancia a la sal y la capacidad de crecer a altas temperaturas.

Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbios brindan una solución al problema actual de depender de productores industriales remotos cuya calidad del producto se ve afectada debido a retrasos en el procesamiento, atascos en la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado y otras contingencias que inhiben la entrega y aplicación oportuna. de, por ejemplo, un producto viable de alto recuento de células y el caldo y los metabolitos asociados en los que se cultivan originalmente las células.

Los productos basados en microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en los que las células se han separado de los metabolitos y nutrientes presentes en los medios de crecimiento de fermentación. Los tiempos de transporte reducidos permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos en el momento y volumen que requiera la demanda local.

La producción local y la entrega dentro de, por ejemplo, 24 horas de fermentación dan como resultado composiciones puras de alta densidad celular y costos de envío sustancialmente más bajos. Dadas las perspectivas de un rápido avance en el desarrollo de inoculantes microbianos más eficaces y potentes, los consumidores se beneficiarán enormemente de esta capacidad para distribuir rápidamente productos basados en microbios.

EJEMPLOS

Puede obtenerse 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 limitantes de la invención. Se pueden realizar numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

EJEMPLO 1 – CO-CULTIVO DE *M. XANTHUS* Y LA CEPA 111 PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOTENSOACTIVOS E HIDROCARBUROS

La "cepa 111" de *Pseudomonas chlororaphis* se cultiva en un reactor a pequeña escala durante al menos 48 horas para producir un inóculo del 3.0 al 5%. *Myxococcus xanthus* se cultiva en un reactor a pequeña escala durante al menos 4 días para producir un inóculo de 0.6-1.0%. El *M. xanthus* El inóculo se puede muestrear y analizar usando franjas en portaobjetos después de 3 días para probar su pureza.

Se inocula un reactor de fermentación con los dos inóculos. El medio nutritivo comprende:

Glucosa	1 a 5 g/L
Peptona de caseína	5 a 20 g/L
Glicerol	10 a 30 g/L
Extracto de levadura	1 a 5 g/L
KH ₂ PO ₄	1 a 5 g/L
Na ₂ HPO ₄	1 a 5 g/L
NH ₄ NO ₃	0.1 a 0.5 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 a 0.1 g/L
FeSO ₄	0.001 a 0.05 g/L
Metales traza	0.1 a 1.0 g/L

Además, el medio nutritivo incluye un vehículo de anclaje particulado de grano fino que comprende celulosa (1.0 a 5.0 g/L) y/o harina de maíz (1.0 a 8.0 g/L).

5 Se alimenta al reactor una solución de base acuosa que comprende NaOH al 20% para ajustar y mantener el pH automáticamente entre 6.8 y 7.0 aproximadamente. Luego, se agrega aceite de canola y/o vegetal (10 a 30 ml/L) para reducir la producción de espuma en el reactor y servir como una fuente adicional de nutrientes. Se puede administrar aceite de canola/vegetal adicional durante la fermentación según sea necesario para reducir la espuma y/o complementar el medio nutritivo.

10 La temperatura se mantiene a unos 24°C; la DO se mantiene en aproximadamente el 50%; y el caudal de aire se mantiene en aproximadamente 1 vvm.

El cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 5 días. El muestreo del fermentador y el tanque de recolección de espuma para el recuento de UFC y/o pureza se realiza a las 0 horas, luego dos veces al día durante la fermentación. El muestreo también puede ocurrir en el momento en que ocurre la recolección del cultivo, es decir, después de 5 días de cultivo.

15 El cultivo bacteriano comprende biotensoactivos y otros subproductos del crecimiento microbiano, incluidos pigmentos de color naranja a rojo, lo que indica la presencia de carotenoides (tetraterpenoides).

20 Una vez finalizado el ciclo de fermentación, el cultivo se recoge del reactor. También se puede producir una capa de espuma que comprende subproductos del crecimiento microbiano durante la fermentación. Esta capa de espuma se extrae y se recoge en un recipiente de recogida. La extracción de espuma se puede realizar durante la fermentación y/o al final de la fermentación.

El cultivo recolectado, así como la espuma extraída, se pueden procesar para purificar biotensoactivos y compuestos orgánicos usando, por ejemplo, extracción con acetato de etilo y/o purificación por evaporación rotatoria.

5 Los subproductos del crecimiento, ya sea en forma purificada o sin purificar, pueden analizarse para confirmar, por ejemplo, la presencia de biotensoactivos. Se midieron los subproductos de crecimiento de la cepa 111 para determinar la capacidad de reducción de la tensión superficial, lo que indica la presencia de biotensoactivos. Cuando se añadió al agua, la tensión superficial se redujo a aproximadamente 30 mN/m.

10 EJEMPLO 2 - COCULTIVO POR LOTES ALIMENTADOS DE *M. XANTHUS* Y LA CEPA 306 PARA PRODUCIR BIOTENSOACTIVOS

La cepa 306 de *Pseudomonas chlororaphis* se cultiva en un reactor a pequeña escala durante al menos 48 horas para producir un inóculo al 3.0%. *Myxococcus xanthus* se hace crecer en matraces de cultivo (volumen de trabajo de 2 l) durante al menos 4 días para producir un inóculo al 0.5%. El inóculo de *M. xanthus* se puede muestrear y analizar usando franjas en portaobjetos después de 3 días para probar su pureza.

Se inocula un reactor de fermentación con los dos inóculos. El medio nutritivo comprende:

Glucosa	1 a 5 g/L
Peptona de caseína	5 a 20 g/L
Glicerol	10 a 30 g/L
Extracto de levadura	1 a 5 g/L
KH ₂ PO ₄	1 a 5 g/L
Na ₂ HPO ₄	1 a 5 g/L
NH ₄ NO ₃	0.1 a 0.5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 a 0.1 g/L
FeSO ₄	0.001 a 0.05 g/L
Metales traza	0.1 a 1.0 g/L

Además, el medio nutritivo incluye un vehículo de anclaje particulado de grano fino que comprende celulosa (1.0 a 5.0 g/L) y/o harina de maíz (1.0 a 8.0 g/L).

Se alimenta al reactor una solución de base acuosa que comprende NaOH al 20% para ajustar y mantener el pH automáticamente entre 6.8 y 7.0 aproximadamente. Luego, se agrega aceite de

canola y/o vegetal (10 a 30 ml/L) para reducir la producción de espuma en el reactor y servir como una fuente adicional de nutrientes.

5 El cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 5 días. La temperatura se mantiene a unos 24°C; la DO se mantiene en aproximadamente el 50%; y el caudal de aire se mantiene en aproximadamente 1 vvm.

Durante todo el cultivo, el reactor se alimenta con aceite de canola adicional (3%, una vez cada 24 horas) y glicerol (500 g/L, después de 48 horas).

10 La temperatura se mantiene a unos 24°C; la DO se mantiene en aproximadamente el 50%; y el caudal de aire se mantiene en aproximadamente 1 vvm. El muestreo del fermentador y el tanque de recolección de espuma para el recuento de UFC y/o pureza se realiza a las 0 horas, luego dos veces al día durante la fermentación. El muestreo también puede ocurrir en el momento en que ocurre la recolección del cultivo, es decir, después de 5 días de cultivo.

15 Una vez finalizado el ciclo de fermentación, el cultivo se recoge del reactor. También se puede producir una capa de espuma que comprende subproductos del crecimiento microbiano durante la fermentación. Esta capa de espuma se extrae y se recoge en un recipiente de recogida.

El cultivo recolectado, así como la espuma extraída, se pueden procesar para purificar biotensoactivos usando, por ejemplo, extracción con acetato de etilo y/o purificación por evaporación rotatoria.

20 Los subproductos del crecimiento, ya sea en forma purificada o sin purificar, pueden analizarse para confirmar, por ejemplo, la presencia de biotensoactivos. Se midieron los subproductos del crecimiento de la cepa 306 para determinar la capacidad de reducción de la tensión superficial, lo que indica la presencia de biotensoactivos. Cuando se añadió al agua, la tensión superficial se redujo a aproximadamente 27 mN/m.