

CO-CULTIVO DE UNA MIXOBACTERIA Y *ACINETOBACTER* PARA LA PRODUCCIÓN MEJORADA DEL BIOEMULSIFICANTE EMULSAN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. 62/864,113, presentada el 20 de junio de 2019, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cultivo de microorganismos tal como bacterias, levaduras y hongos, es importante para la producción de una amplia variedad de biopreparaciones útiles. Los microorganismos desempeñan un papel crucial, por ejemplo, en las industrias de alimentos, productos farmacéuticos, agricultura, recuperación de petróleo y gas, minería, rehabilitación del medio ambiente y gestión de desechos; sin embargo, uno de los factores que restringen la comercialización de productos basados en microbios ha
15 sido que es particularmente costoso y/o inviable producir estos productos a gran escala.

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

 Los microbios tienen un gran potencial para ser beneficiosos a una amplia variedad de industrias, tal como, por ejemplo, la industria de petróleo y gas a través de la recuperación mejorada
25 microbianamente de petróleo (MEOR). El petróleo existe en pequeños poros y fisuras estrechas dentro del cuerpo de rocas del yacimiento debajo de la superficie de la tierra. La presión natural del yacimiento provoca que el petróleo fluya hacia la superficie, proporcionando de esta manera la producción primaria; sin embargo, a medida que avanza la producción de petróleo, la presión del yacimiento se agota hasta un punto en el que se requiere elevación o bombeo artificial para mantener la producción de petróleo.

30 Cuando es necesario proporcionar energía externa para que el yacimiento logre una recuperación adicional de petróleo (recuperación secundaria o recuperación mejorada de petróleo (EOR)), la energía adicional se puede introducir al inyectar gas (inyección de gas) y/o agua (inundación de agua). En particular, con la inundación de agua, se inyecta agua en el yacimiento subterráneo de petróleo con el propósito de desplazar el petróleo crudo de los espacios de poro de la roca del depósito
35 hacia los pozos productores.

La recuperación primaria da como resultado en general una recuperación promedio de solo una fracción del aceite originalmente presente en una formación que contiene aceite. La recuperación secundaria recupera en general otro 10% en el momento en que se vuelve antieconómico continuar. No es inusual, entonces, que permanezca el 60 a 70% del aceite originalmente en la formación, incluso después de que la recuperación secundaria alcance el límite económico. En esta situación, se puede considerar una tercera etapa de recuperación de petróleo/EOR, llamada producción terciaria.

En esta etapa terciaria, se emplean métodos técnicamente avanzados para ya sea modificar las propiedades de los fluidos del yacimiento o las características de la roca del depósito. En general, los métodos se pueden clasificar en cuatro categorías principales: métodos térmicos, métodos químicos, inyección miscible o inyección de solventes y métodos microbianos.

La recuperación microbiana mejorada de petróleo (MEOR) en particular es un campo multidisciplinario que incorpora, entre otros: geología, química, microbiología, mecánica de fluidos, ingeniería del petróleo, ingeniería ambiental e ingeniería química. Los procesos microbianos que proceden en MEOR se pueden clasificar de acuerdo con el problema de producción de petróleo en el campo: la limpieza del pozo elimina el lodo y otros desechos que bloquean los canales por donde fluye el petróleo; la estimulación del pozo mejora el flujo de petróleo desde el área de drenaje hacia el pozo; y las inundaciones mejoradas de agua aumentan la actividad microbiana al inyectar microbios seleccionados y, a veces, nutrientes.

De esta manera, MEOR utiliza microorganismos y/o sus metabolitos para mejorar la recuperación de aceite residual. Los nutrientes y bacterias adecuadas, que preferentemente crecen bajo condiciones anaeróbicas del yacimiento, se pueden inyectar en un yacimiento. Los subproductos microbianos, que pueden incluir biosurfactantes, biopolímeros, ácidos, solventes, gases y enzimas, por ejemplo, pueden modificar las propiedades del aceite y las interacciones entre el aceite, agua y los medios porosos, alterar la permeabilidad de las formaciones subterráneas y, en última instancia, aumentar la movilidad y recuperación de petróleo.

Específicamente, el interés en los surfactantes microbianos ha aumentado constantemente en los últimos años debido a su diversidad, naturaleza respetuosa con el medio ambiente, posibilidad de producción a gran escala, selectividad, rendimiento bajo condiciones extremas y posibles aplicaciones en la protección del medio ambiente. Los surfactantes producidos por microbios, es decir, los biosurfactantes reducen la tensión interfacial entre el agua y el aceite y, por lo tanto, se requiere una presión hidrostática más baja para mover el líquido atrapado en los poros para superar el efecto capilar. En segundo lugar, los biosurfactantes contribuyen a la formación de micelas que proporcionan un mecanismo físico para movilizar el petróleo en una fase acuosa en movimiento.

Otros subproductos microbianos también han aumentado en importancia, incluidas ciertas enzimas, ácidos, gases y biopolímeros.

A medida que los pozos de petróleo maduran, el bombeo de petróleo a una tasa económicamente viable se vuelve más difícil y costoso. Los pozos de petróleo que se acercan al final de su vida útil económica se llaman pozos “marginales” o “agotados”. Estos pozos a menudo se abandonan prematuramente, dejando cientos o incluso miles de barriles de valioso petróleo crudo. En consecuencia, existe la necesidad continua de desarrollar métodos mejorados de recuperación de petróleo, incluso de pozos que se podrían considerar demasiado maduros para ser productivos. De esta manera, los métodos de cultivo y producción en masa de microorganismos y metabolitos microbianos que podrían ser útiles en MEOR podrían beneficiar enormemente a la industria del petróleo y gas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para producir microorganismos y sus subproductos de crecimiento. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos mejorados para producir biopolímeros microbianos y otros metabolitos microbianos útiles. Ventajosamente, los productos y métodos basados en microbios de la presente invención son respetuosos con el medio ambiente, amigables con el funcionamiento y rentables.

En modalidades preferidas, la presente invención proporciona métodos para producir uno o más subproductos de crecimiento microbiano, los métodos comprenden co-cultivar una mixobacteria y una bacteria *Acinetobacter* spp. en un sistema de fermentación. Ventajosamente, en ciertas modalidades, la biomasa celular total y/o la producción total del uno o más subproductos de crecimiento logrados cuando se usan los métodos de la presente es mayor que cuando los cultivos puros de los microbios individuales se cultivan por separado.

En ciertas modalidades preferidas, se proporcionan métodos para co-cultivar microorganismos y/o para la producción de uno o más subproductos de crecimiento microbiano, los métodos comprenden inocular un sistema de fermentación que comprende un medio de crecimiento líquido con un primer microorganismo y un segundo microorganismo, en donde el primer microorganismo es una mixobacteria y el segundo microorganismo es una bacteria *Acinetobacter* spp.

En una modalidad, la mixobacteria es una bacteria *Stigmatella* spp. y la *Acinetobacter* es, por ejemplo, *A. venetianus*. En una modalidad, la *A. venetianus* es la cepa RAG-1 (ATCC 31012).

Los microorganismos se pueden co-cultivar utilizando procesos de cultivo que varían de pequeña a gran escala. Estos procesos de cultivo pueden incluir, pero no se limitan a, cultivo/fermentación sumergida, fermentación en estado sólido (SSF) e híbridos, modificaciones y/o combinaciones de estos. En algunas modalidades, el proceso de cultivo es un proceso alimentado por lotes.

En una modalidad, el co-cultivo se lleva a cabo usando fermentación sumergida. En una modalidad, se utiliza un híbrido de SSF y fermentación sumergida, en donde un portador de anclaje de partículas se suspende en el medio de cultivo líquido para servir como un sitio para la unión celular y/o

formación de biopelícula. Esto es particularmente útil para el crecimiento de mixobacterias, que pueden presentar un crecimiento mejorado en una superficie sólida.

El medio de crecimiento líquido puede comprender fuentes de, por ejemplo, carbono, nitrógeno, proteínas, vitaminas y/o minerales. En ciertas modalidades, el medio nutriente se personaliza para producir una alta concentración de uno o más subproductos específicos de crecimiento microbiano. En una modalidad, el medio nutriente líquido comprende un preventor de espuma, tal como, por ejemplo, aceite de canola.

En algunas modalidades, el portador de anclaje de partículas se suspende en el medio de cultivo líquido antes, simultáneamente o después de que el medio de cultivo líquido se inocule con el primer y/o segundo microorganismos.

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

El portador de anclaje puede ser inerte, o puede transportar y/o comprender nutrientes adicionales y/o inoculante microbiano. En ciertas modalidades, el portador de anclaje puede ser poroso. El portador de anclaje puede comprender materiales sintéticos y/o materiales derivados de forma natural.

En una modalidad, el portador de anclaje comprende bolas hechas de, por ejemplo, vidrio, un polímero (por ejemplo, ácido poliláctico (PLA)), agar o gelatina. El portador de anclaje puede ser piezas de, por ejemplo, una esponja de luffa o esponja picada. En una modalidad, el portador de anclaje puede comprender alimento, por ejemplo, semillas, nueces, frijoles o incluso trozos de fruta picada, tal como plátanos.

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

Ventajosamente, el uso del portador de anclaje proporciona una mayor producción de biomasa bacteriana debido, por ejemplo, al área superficial aumentada sobre la cual las bacterias se pueden unir y acumular. Adicionalmente, la acumulación de biomasa bacteriana puede conducir a aumentos en la producción de subproductos beneficiosos de crecimiento, tal como biopolímeros y otros metabolitos secundarios.

En una modalidad, las bacterias crecen en forma de una biopelícula en el portador de anclaje de partículas. En una modalidad, algunas bacterias crecen en el medio de cultivo líquido y algunas bacterias crecen en el portador de anclaje de partículas.

En algunas modalidades, el método de cultivo utiliza cultivo alimentado por lotes. El reactor de fermentación se puede alimentar, por ejemplo, con un antiespumante basado en aceite, fuentes de carbono (por ejemplo, parafina licuada), ajustadores de pH y/u otras fuentes adicionales de nutrientes según sea necesario. La "alimentación" del reactor de fermentación puede presentarse, por ejemplo, a las 24 horas, a las 48 horas o múltiples veces, por ejemplo, cada 24 a 48 horas.

De acuerdo con los métodos de la presente, el primer y segundo microorganismos 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 de crecimiento microbiano. En algunas modalidades, la fermentación se presenta durante 24 horas hasta 2 o 3 días o más, a una temperatura de 20 a 30 °C.

En modalidades preferidas, los métodos de la presente invención se pueden usar para producir uno o más subproductos de crecimiento microbiano. En ciertas modalidades, los subproductos de crecimiento son uno o más biopolímeros.

En modalidades específicas, los métodos se pueden utilizar para producir el bioemulsificante Emulsan, un biopolímero con capacidades de emulsión. En ciertas modalidades, los métodos se pueden usar para producir de 1 a 100 g/L de Emulsan.

En algunas modalidades, el uno o más subproductos de crecimiento también pueden incluir otros metabolitos, por ejemplo, enzimas, biosurfactantes, ácidos, solventes, gases, proteínas, péptidos, aminoácidos, alcoholes, hormonas, lípidos, carbohidratos, antibióticos, pigmentos y otros compuestos bioactivos.

De manera ventajosa, en ciertas modalidades, los métodos de la presente invención pueden dar como resultado la producción de biopolímeros y/u otros subproductos de crecimiento a concentraciones mayores que cuando se cultivan cultivos puros de los microbios individuales.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona productos basados en microbios producidos de acuerdo con los métodos de la presente, así como sus usos en, por ejemplo, producción mejorada de petróleo, biorremediación y minería; eliminación y tratamiento de desechos; promoción de la salud y productividad vegetal; y recuperación y/o restauración de la salud de los suelos.

Los productos basados en microbios pueden comprender todo el cultivo producido de acuerdo con los métodos de la presente, incluidos el primer y/o segundo microorganismo y/o sus subproductos de crecimiento, así como medio de crecimiento residual, portador de anclaje particulado y/o nutrientes.

Los microorganismos pueden ser vivos, viables o en forma inactiva. Pueden estar en forma de una biopelícula, células vegetativas, esporas y/o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, no hay microbios presentes, en donde la composición comprende subproductos de crecimiento microbiano, por ejemplo, biopolímeros, que se han extraído del cultivo y, opcionalmente, purificado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

En modalidades preferidas, la presente invención proporciona métodos para la producción mejorada de uno o más subproductos de crecimiento microbiano, los métodos comprenden co-cultivar una mixobacteria y una cepa de *Acinetobacter* spp. En una modalidad específica, los subproductos de crecimiento incluyen un biopolímero, tal como, por ejemplo, Emulsan.

Los subproductos de crecimiento también pueden incluir otros metabolitos, por ejemplo, enzimas, biosurfactantes, ácidos, solventes, gases, proteínas, péptidos, aminoácidos, alcoholes, hormonas, lípidos, carbohidratos, antibióticos y otros compuestos orgánicos y/o bioactivos.

De manera ventajosa, la biomasa celular total y/o la producción total del uno o más subproductos de crecimiento logrados de acuerdo con los métodos de la presente pueden ser mayores que cuando se cultivan por separado los cultivos puros de los microbios individuales.

Definiciones Seleccionadas

Como se usa en la presente, una "biopelícula" es un agregado complejo de microorganismos, tal como bacterias, en donde las células se adhieren entre sí y/o a una superficie usando una matriz extracelular de polisacáridos. Las células en las biopelículas son fisiológicamente distintas de las células planctónicas del mismo organismo, que son células individuales que pueden flotar o nadar en medio líquido.

Como se usa en la presente, "co-cultivo" significa 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 modalidad, esta relación antagónica o simbiótica puede dar como resultado un efecto mejorado, por ejemplo, el efecto deseado se puede magnificar cuando se compara con lo que resulta de cultivar solo uno de los microorganismos elegidos por sí solo. En una modalidad de ejemplo, un microorganismo, por ejemplo, una *Stigmatella* sp., puede servir como un estimulador para la producción de biopolímeros u otros metabolitos por el otro microorganismo, por ejemplo, una *Acinetobacter* sp.

Como se usa en la presente, "mejora" se refiere a mejorar y/o aumentar.

Como se usa en la presente, "fermentación" se refiere al cultivo o crecimiento de células bajo condiciones controladas. El crecimiento podría ser aeróbico o anaeróbico.

Como se usa en la presente, una molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido, proteína, compuesto orgánico u otro compuesto, “aislado” o “purificado”, está sustancialmente libre de otro material, tal como material celular, genes o secuencias de genes y/o aminoácidos o secuencias de aminoácidos, con los cuales está asociado en la naturaleza. Una cepa microbiana purificada o aislada se retira del ambiente en el que existe en la naturaleza y/o en el que se cultivó. De esta manera, la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo biológicamente puro o como esporas (u otras formas de la cepa).

En ciertas modalidades, los compuestos purificados son al menos 60% en peso el compuesto de interés. De manera preferente, la preparación es al menos 75%, más preferentemente al menos 90%, y más preferentemente al menos 99%, en peso del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que es, preferentemente, al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, o 100% (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide por cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, por cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Como se usa en la presente, 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. De esta manera, la composición basada en microbios puede comprender los microbios mismos y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en un 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, biosurfactantes), componentes de 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, a 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} o 1×10^{12} o más CFU por mililitro de la composición.

Como se usa en la presente, un “producto basado en microbios” es un producto que se aplicará en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto basado en microbios puede ser simplemente una composición basada en microbios recolectada del proceso de cultivo. Alternativamente, el producto basado en microbios puede comprender ingredientes adicionales que se han agregado. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizadores, amortiguadores, portadores (por ejemplo, soluciones de agua o sal), nutrientes añadidos para respaldar el crecimiento microbiano adicional, potenciadores de crecimiento no nutritivos y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el ambiente al que se aplica. El producto basado en microbios también puede comprender mezclas de composiciones basadas en microbios. El producto basado en microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición basada en microbios que se

han procesado de alguna manera tal como, pero no se limitan a, filtrado, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa en la presente, “polímero” se refiere a cualquier compuesto macromolecular preparado mediante la unión de una o más unidades moleculares similares, llamadas monómeros, entre sí. Los polímeros incluyen polímeros sintéticos y naturales. Los polímeros de ejemplo incluyen cauchos, almidones, resinas, gomas (por ejemplo, goma guar, goma xantana y goma welan), neopreno, nailon, PVC, silicona, celulosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, poliacrilonitrilo, poliaminas, polisacáridos (por ejemplo, Emulsan), polinucleótidos, tereftalato de adipato de polibutileno (PBAT), polihidroxialcanoatos (PHA), succinato de polietileno (PBS), policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), polihidroxibutiratos (PHB), poliésteres tal como polilactida (PLA), poliacrilamidas (PAM) y otros.

Además, en el término polímero se incluye el término “biopolímero”, “polímero biológico” o “polímero renovable”, que como se usa en la presente, significa una sustancia polimérica natural, o una sustancia polimérica producida por, o que se presenta en, un organismo vivo. Una característica de los biopolímeros es su capacidad de biodegradarse. Los biopolímeros pueden incluir polinucleótidos (por ejemplo, ARN y ADN), polisacáridos (por ejemplo, carbohidratos poliméricos enlazados linealmente) y polipéptidos (es decir, polímeros de aminoácidos). Los ejemplos específicos de biopolímeros incluyen, pero no se limitan a, cauchos, Emulsan, suberina, melanina, lignina, celulosa, goma xantana, goma guar, goma welan, levan, alginato y muchos otros.

Tal como se usa en la presente, “reduce” significa una alteración negativa de al menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100%.

Como se usa en la presente, “surfactante” significa un compuesto que disminuye la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos, entre un líquido y un gas, o entre un líquido y un sólido. Un “biosurfactante” es una sustancia activa en la superficie 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 mencionados. Por el contrario, la frase transitoria “que consiste de” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase de transición “que consiste esencialmente de” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados “y aquellos que no afectan materialmente la o las características básicas y novedosas” de la invención reivindicada. El uso del término “que comprende” contempla otras modalidades que “consisten” o “consisten esencialmente” de los componentes mencionados.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente, se entiende que el término “o” es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea

obvio a partir del contexto, como se usa en la presente, se entiende que los términos "un", "y" el "y" la "son singulares o plurales.

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

La mención de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo o combinación de grupos enumerados. La mención de una modalidad para una variable o aspecto en la presente incluye esa modalidad como cualquier modalidad individual o en combinación con cualquier otra modalidad o porciones de esta.

Cualquier composición o método proporcionado en la presente se puede combinar con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en la presente.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las modalidades preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones. Todas las referencias citadas en la presente se incorporan como referencia.

Métodos de Co-Cultivo

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 modalidades preferidas, la presente invención proporciona métodos mejorados para producir uno o más subproductos de crecimiento microbiano, en donde los métodos comprenden co-cultivar dos o más microorganismos diferentes en un reactor de fermentación.

De manera ventajosa, la biomasa celular total y/o la producción total del uno o más subproductos de crecimiento logrados cuando se utilizan los presentes métodos de co-cultivo pueden ser mayores en comparación con cuando se cultivan los cultivos de los microbios individuales.

Más específicamente, en modalidades preferidas, la presente invención proporciona métodos para mejorar la producción de uno o más subproductos de crecimiento microbiano, el método comprende co-cultivar un primer microorganismo y un segundo microorganismo en un reactor de fermentación sumergido bajo condiciones favorables para el crecimiento y producción del uno o más subproductos de crecimiento. En ciertas modalidades, el primer microorganismo es una mixobacteria y el segundo microorganismo es una cepa de *Acinetobacter* spp.

Los microorganismos se pueden co-cultivar utilizando sistemas de cultivo que varían de 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 estos.

En ciertas modalidades preferidas, los métodos para co-cultivar microorganismos y/o para producir subproductos de crecimiento microbiano comprenden: inocular un sistema de fermentación que comprende un medio nutriente líquido con un primer microorganismo e inocular el sistema de fermentación con un segundo microorganismo, en donde el primer microorganismo es una bacteria de *Stigmatella* spp. y el segundo microorganismo es una cepa de *Acinetobacter* spp. Aún de manera más preferente, en una modalidad, la *Stigmatella* es *S. aurantiaca* y el *Acinetobacter* es una cepa de *A. venetianus*. En una modalidad, la cepa de *A. venetianus* es "RAG-1" (ATCC 31012).

En ciertas modalidades, el método de co-cultivo utiliza fermentación sumergida. En ciertas modalidades, se usa un híbrido de fermentación en estado sólido y fermentación sumergida, en donde un portador de anclaje de partículas se suspende en el medio de cultivo líquido para servir como un sitio para la unión celular y/o formación de biopelícula. Esto es particularmente útil para el crecimiento de mixobacterias, que pueden presentar un crecimiento mejorado en una superficie sólida u otro portador.

El recipiente de crecimiento de microbios utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivo para uso industrial. En una modalidad, 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, tal como pH, oxígeno, presión, temperatura, potencia del árbol del agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de metabolito.

En una modalidad adicional, el recipiente también puede ser capaz de monitorear el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, la medición de la cantidad de células y fases de crecimiento). Alternativamente, las muestras se pueden tomar en cualquier punto durante la fermentación con el fin de realizar, por ejemplo, conteo de CFU y/o mediciones de pureza. En una modalidad, el muestreo se realiza al inicio de la fermentación y múltiples veces al día (por ejemplo, dos veces al día) durante la fermentación.

En algunas modalidades, el método de cultivo utiliza cultivo alimentado por lotes. El reactor de fermentación se puede alimentar, por ejemplo, con un antiespumante basado en aceite, fuentes de carbono (por ejemplo, parafina licuada), ajustadores de pH y/u otras fuentes adicionales de nutrientes según sea necesario.

En una modalidad, el reactor de fermentación está conectado a un recipiente de alimentación. El recipiente de alimentación contiene preferentemente medio nutriente líquido y/o las otras sustancias para alimentar (por ejemplo, transferir o complementar), en el reactor de fermentación. La "alimentación" del reactor de fermentación puede presentarse de forma continua o en puntos de tiempo designados a lo largo del cultivo.

En ciertas modalidades, los puntos de tiempo de alimentación designados son a las 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 52 horas después del inicio del cultivo. En ciertas modalidades, hay múltiples puntos de tiempo en los cuales el medio nutriente 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 el cultivo.

En una modalidad, el reactor de fermentación está conectado a un recipiente de recolección de espuma. A pesar del uso de una solución antiespumante en el medio nutriente y/o alimento, algunas cantidades de espuma todavía se producen naturalmente por el proceso de fermentación. En algunas modalidades, la espuma se extrae automáticamente y/o manualmente del reactor y se recoge en el recipiente de recolección de espuma. En algunas modalidades, la espuma recolectada comprende subproductos de crecimiento microbiano, tal como biosurfactantes, que se pueden extraer y, opcionalmente, purificar.

En una modalidad, el medio nutriente líquido comprende una fuente de carbono. La fuente de carbono puede ser un carbohidrato, tal 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 tal como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; hidrocarburos, grasas y/o aceites, tal como aceite de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de ajonjolí, aceite de canola, aceite de linaza y/o parafinas; melaza en polvo, etc. Estas fuentes de carbono se pueden utilizar independientemente o en una combinación de dos o más.

En una modalidad, el medio nutriente 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 utilizar independientemente o en una combinación de dos o más.

En una modalidad, una o más sales inorgánicas también se pueden incluir en el medio nutriente líquido. Las sales inorgánicas pueden incluir, por ejemplo, fosfato diácido de potasio, fosfato de monopotasio, fosfato ácido dipotásico, fosfato ácido disódico, 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 utilizar independientemente o en una combinación de dos o más.

En una modalidad, los factores de crecimiento y nutrientes traza para microorganismos se incluyen en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se cultivan microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que requieren. También se pueden incluir en el medio nutrientes inorgánicos, incluidos oligoelementos tal como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto.

Adicionalmente, se pueden incluir fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales, proteínas y microelementos, por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de papa, extracto de carne, extracto de soja, extracto de cáscara de plátano y similares, o en formas purificadas. También se pueden incluir aminoácidos tal como, por ejemplo, aquellos útiles para la biosíntesis de proteínas.

- 5 En algunas modalidades, el portador de anclaje de partículas se suspende en el medio de cultivo líquido antes, simultáneamente o después de que el medio de cultivo líquido se inocule con el primer y/o segundo microorganismos.

10 El portador de anclaje de partículas puede ser cualquier material adecuado para servir como un sitio de nucleación para el crecimiento y unión bacteriana. En algunas modalidades, 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 o 0.5 mm de diámetro. Las bacterias se unirán a las piezas y se acumularán en ellas, produciendo masas portadoras de bacterias.

- 15 El portador de anclaje puede ser inerte, o puede transportar y/o comprender nutrientes adicionales y/o inoculante microbiano. En ciertas modalidades, el portador de anclaje puede ser poroso.
El portador de anclaje puede comprender materiales sintéticos y/o materiales derivados de forma natural.

20 En una modalidad, el portador de anclaje comprende perlas de alginato de sodio. Las perlas se pueden preparar, por ejemplo, al agregar de forma continua una solución que comprende 1 a 5%, o 2 a 3% de alginato de sodio aséptico y, opcionalmente, nutrientes y/o inoculante bacteriano, en una solución estéril de 1 a 7%, o 2 a 5% de cloruro de calcio para formar perlas.

25 En una modalidad, el portador de anclaje puede comprender bolas hechas de, por ejemplo, vidrio, un polímero (por ejemplo, ácido poliláctico (PLA)), agar o gelatina. En una modalidad, el portador de anclaje puede ser piezas de, por ejemplo, una esponja de luffa o esponja picada. En una modalidad, el portador de anclaje puede comprender alimento, por ejemplo, semillas, nueces, frijoles o incluso trozos de fruta picada, tal como plátanos.

En modalidades preferidas, el portador de anclaje comprende granos finos de celulosa y/o harina de maíz. En una modalidad, se prefiere el uso de granos finos sobre partículas más grandes (por ejemplo, mayores de 5 mm), porque facilita el aumento en escala del proceso.

30 De manera ventajosa, el uso del portador de anclaje proporciona una mayor producción de biomasa bacteriana debido, por ejemplo, al área superficial aumentada a la cual las bacterias se pueden unir y acumular. Adicionalmente, la acumulación de biomasa bacteriana puede conducir a incrementos en la producción de subproductos beneficiosos de crecimiento, tal como los biosurfactantes.

35 En una modalidad, las bacterias crecen en forma de una biopelícula en el portador de anclaje. En una modalidad, algunas bacterias crecen en el medio de cultivo líquido en forma planctónica, y algunas bacterias crecen en el portador de anclaje.

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

5 El método de co-cultivo puede proporcionar además oxigenación al cultivo en crecimiento. Una modalidad utiliza el movimiento lento del aire para remover el aire que contiene bajo contenido de oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado puede ser aire ambiente 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 de oxígeno en el líquido.

10 En ciertas modalidades, los niveles de oxígeno disuelto (DO) se mantienen en aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, aproximadamente 35% a aproximadamente 65%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, o aproximadamente 50% de saturación de aire. El flujo de aire se puede suministrar a, por ejemplo, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.0 v/m, o aproximadamente 1.0 a aproximadamente 1.5 vvm.

15 En algunas modalidades, el método para el co-cultivo puede comprender además agregar ácidos y/o antimicrobianos en el medio líquido antes y/o durante el proceso de co-cultivo para proteger el cultivo contra la contaminación.

20 En una modalidad, antes de la inoculación, los componentes del medio de cultivo líquido se pueden esterilizar. Si se utiliza, el portador de anclaje también se esteriliza preferentemente, por ejemplo, usando un autoclave u otro método conocido en la técnica. Adicionalmente, el agua utilizada para preparar el medio se puede filtrar para evitar contaminación.

25 En una modalidad, la esterilización del medio nutriente líquido se puede lograr al colocar los componentes del medio de cultivo líquido en agua a una temperatura de aproximadamente 85-100 °C. En una modalidad, la esterilización se puede lograr al disolver los componentes en peróxido de hidrógeno al 1 a 3% en una relación de 1:3 (p/v).

30 En una modalidad, el equipo utilizado para co-cultivo es estéril. El equipo de cultivo tal como el reactor/recipiente puede estar separado de, pero conectado a, una unidad de esterilización, por ejemplo, un autoclave. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que se esteriliza *in situ* antes de comenzar la inoculación. El aire se puede esterilizar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el aire ambiente puede pasar a través de al menos un filtro antes de ser introducido en el recipiente. En otras modalidades, el medio se puede pasteurizar o, opcionalmente, no se puede agregar calor en absoluto, donde se puede aprovechar el uso del pH y/o baja actividad de agua para controlar el crecimiento microbiano no deseado.

35 El pH de la mezcla debe ser adecuado para el o los microorganismos de interés. En algunas modalidades, el pH es de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 11.0, aproximadamente 3.0 a

aproximadamente 10.0, aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0, aproximadamente 5.0 a aproximadamente 8.0 o aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.0. En una modalidad, el pH es de aproximadamente 6.6 a 6.9. Los amortiguadores y reguladores de pH se pueden usar para estabilizar el pH cerca de un valor preferido. En ciertas modalidades, una solución básica (por ejemplo, solución de NaOH al 15 a 25% o 20%) y/o una solución ácida (por ejemplo, ácido cítrico al 15 a 25% o 20%) se incluye en el medio nutriente líquido o se alimenta en el 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.

En una modalidad, el método para el co-cultivo de microorganismos se lleva a cabo a aproximadamente 5° a aproximadamente 100° C, aproximadamente 15° a aproximadamente 60° C, aproximadamente 20° a aproximadamente 45° C, o aproximadamente 24° a aproximadamente 30° C. En una modalidad, el co-cultivo se puede llevar a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra modalidad, el co-cultivo puede estar sujeto a temperaturas cambiantes.

De acuerdo con los métodos de la presente, el primer y segundo microorganismos 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 de 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 modalidades, la fermentación se presenta durante 24 horas a 1 semana, aproximadamente 2 a 5 días o aproximadamente 2 a 3 días. Los subproductos de crecimiento microbiano producidos por los microorganismos se pueden retener en los microorganismos o secretarse en el medio de crecimiento. En ciertas modalidades, el subproducto de crecimiento se produce en la forma de una capa de espuma en la parte superior del cultivo.

En otra modalidad, el método para producir subproductos de crecimiento microbiano puede comprender además pasos de extracción, concentración y/o purificación del subproducto de crecimiento microbiano de interés. De manera alternativa, los subproductos de crecimiento microbiano se pueden utilizar en su forma bruta, lo que significa que no se realiza purificación. En una modalidad adicional, el medio de crecimiento puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto de crecimiento microbiano.

Los métodos se pueden realizar en un proceso continuo, cuasicontinuo o por lotes o en un proceso alimentado por lotes.

En una modalidad, toda la espuma, medio nutriente, células y/o masas portadoras de bacterias se eliminan al completar el co-cultivo (por ejemplo, al lograr, por ejemplo, una densidad celular deseada o una cantidad de metabolito). La masa celular restante se puede reciclar y/o hidrolizar para obtener

cualquier compuesto sobrante presente en las células. En este procedimiento por lotes, se inicia un lote completamente nuevo al cosechar el primer lote.

En una modalidad, el proceso es un proceso alimentado por lotes, donde ciertas fuentes de nutrientes y/u otras sustancias se alimentan al reactor en determinados puntos de tiempo para reponer el medio nutriente y/o aumentar la eficiencia del proceso. Todo el lote se cosecha al final del ciclo de cultivo y se inicia un lote completamente nuevo al cosechar el primer lote.

En una modalidad, el proceso es continuo o casi continuo, donde los subproductos de crecimiento de interés se recogen del cultivo, por ejemplo, de la espuma que se forma durante el co-cultivo y/o del medio nutriente líquido. En modalidades preferidas, la espuma y/o medio se coloca en un recipiente de recolección con un medidor de pH opcional. La biomasa y/o portadores de anclaje inoculados con células viables permanecen en el reactor de fermentación como un inoculante y el medio nutriente se repone, por ejemplo, desde un tanque de alimentación que contiene medio nutriente fresco, para continuar el crecimiento microbiano y producción de metabolitos.

En una modalidad, la espuma se puede extraer de forma consistente, lo que significa, por ejemplo, cada 1 a 24 horas, cada dos días o cada 2 a 7 días. En otra modalidad, la espuma se puede extraer al alcanzar un cierto volumen. La composición que se elimina puede ser una espuma o caldo libre de células y/o puede contener algunas células.

La espuma y/o caldo que se recolectan del sistema de cultivo se pueden procesar mediante lavado y/o centrifugación para extraer los subproductos de crecimiento microbiano. Opcionalmente, los subproductos de crecimiento luego se pueden almacenar, purificar y/o usar directamente en forma bruta.

En una modalidad, algunos o todos los portadores de anclaje, si se usan, se pueden recolectar del cultivo y lavarse usando un solvente, por ejemplo, etanol de baja concentración (por ejemplo, 1 a 2%). El líquido resultante luego se centrifuga para separar los subproductos de crecimiento y la masa celular.

De manera ventajosa, la biomasa celular total y/o la producción total del uno o más subproductos de crecimiento logrados cuando se utilizan los presentes métodos de co-cultivo pueden ser mayores en comparación con cuando los cultivos puros de los microbios individuales se cultivan por sí solos.

En ciertas modalidades, la biomasa celular total lograda de acuerdo con los métodos de la presente 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 microorganismos se cultivan individualmente.

En ciertas modalidades, la concentración total de un subproducto de crecimiento producido de acuerdo con los métodos de la presente 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 microorganismos se cultivan individualmente.

Microorganismos

Los microorganismos cultivados de acuerdo con 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 se pueden transformar con genes específicos para exhibir características específicas. Los microorganismos también pueden ser mutantes de una cepa deseada. Como se usa en la presente, “mutante” significa una cepa, variante genética o subtipo de un microorganismo de referencia, en donde el mutante tiene una o más variaciones genéticas (por ejemplo, una mutación puntual, mutación de sentido erróneo, mutación sin sentido, delección, duplicación, mutación de cambio de marco o expansión de repetición) en comparación con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para elaborar mutantes son bien conocidos en la técnica microbiológica. Por ejemplo, con este fin se utilizan ampliamente mutagénesis UV y nitrosoguanidina.

En modalidades preferidas, los microorganismos son bacterias, incluidas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En modalidades 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 de cuerpos fructíferos, que son agregados simples o ramificados que contienen mixosporas. Durante la depredación, las bacterias secretan moléculas depredadoras, incluidas enzimas, antibióticos y otros metabolitos secundarios, que pueden incluir, por ejemplo, biosurfactantes.

Las mixobacterias incluyen, por ejemplo, *Myxococcus* spp. (por ejemplo, *M. xanthus*, *M. fulvus*, *M. flavescens*, *M. macrosporus*, *M. stipitatus*, *M. virescens*, *M. coralloides*, and *M. disciformis*), *Stigmatella* spp., *Sorangium cellulosum*, *Minicystis rosea*, y *Chondromyces crocatus*.

En modalidades preferidas, la mixobacteria es una *Stigmatella* sp. seleccionada de, por ejemplo, *S. aurantiaca*, *S. erecta* y *S. hybrid*. Aún más preferentemente, se usa *S. aurantiaca*.

En ciertas modalidades, el segundo microorganismo se selecciona de bacterias de *Acinetobacter* spp. Los miembros de este género gramnegativo, aeróbico y no fermentador se pueden aislar de una amplia variedad de hábitats diferentes, incluidos agua, suelo y organismos vivos y, a pesar de haber sido descritos como no móviles, poseen diferentes formas de motilidad (por ejemplo, espasmos).

Preferentemente, la especie de *Acinetobacter* es *A. venetianus*. En ciertas modalidades, se usa una cepa de *Acinetobacter venetianus* conocida como “RAG-1” (ATCC 31012). Las cepas de *A. venetianus* son una herramienta útil en la recuperación de petróleo y biorremediación, ya que han desarrollado diversas estrategias de degradación de *n*-alcanos, tal como aquellas que se encuentran en el petróleo crudo. RAG-1, en particular, puede producir, por ejemplo, Emulsan y esterases para ese propósito.

En modalidades preferidas, *S. aurantiaca* y una cepa de *A. venetianus* se co-cultivan de acuerdo con los métodos de la presente. De manera ventajosa, en algunas modalidades, la biomasa celular del co-cultivo de estas dos cepas es mayor que cuando se cultivan cultivos puros de los microbios individuales. Adicionalmente, en algunas modalidades, la producción de biopolímeros y/u otros metabolitos en co-cultivo es mayor que cuando se utilizan cultivos puros de los microbios individuales.

En ciertas modalidades, esta producción mejorada de subproductos de crecimiento y/o metabolitos se provoca por el co-cultivo, en donde la presencia de un microorganismo competidor induce la producción mejorada de, por ejemplo, moléculas defensivas y/o promotores de autocrecimiento. En ciertas modalidades, estos son biopolímeros y/o biosurfactantes.

Subproductos de Crecimiento Microbiano

Los métodos y sistemas de la presente invención se pueden utilizar para producir composiciones que comprenden uno o más subproductos de crecimiento microbiano útiles tal como, por ejemplo, biopolímeros y/u otros metabolitos microbianos.

En una modalidad preferida, los subproductos de crecimiento son uno o más biopolímeros. Por ejemplo, en una modalidad, los métodos son útiles para la producción del potente compuesto emulsionante, Emulsan. Emulsan es un bioemulsionante de polisacárido anfipático que interactúa entre las membranas celulares y aceite, facilitando de esta manera el proceso de captación de n-alcenos en la célula. También se puede usar para reducir la tensión superficial e interfacial dentro de un pozo de petróleo, así como para facilitar el transporte de petróleo a través de tuberías a través de la emulsificación de petróleo crudo y la disminución de la viscosidad del petróleo crudo. Emulsan también se cree que es útil en otras industrias, por ejemplo, la atención médica, donde podría tener potencial para su uso como adyuvante para la administración de vacunas.

En ciertas modalidades, los métodos se pueden utilizar para producir de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 g/L, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 g/L, o aproximadamente 5 a aproximadamente 25 g/L de Emulsan.

En algunas modalidades, los subproductos de crecimiento microbiano también pueden incluir uno o más biosurfactantes. Los biosurfactantes de acuerdo con la presente invención pueden incluir, por ejemplo, glicolípidos (por ejemplo, soforolípidos, lípidos de manosileritritol, lípidos de trehalosa, ramnolípidos y lípidos de celobiosa), lipopéptidos (por ejemplo, surfactinas, iturinas, fengicinas, liquenisinas, plipastatinas, viscosina, artrofactina y kurstakins), flavolípidos, fosfolípidos, ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos, lipoproteínas, complejos de lipopolisacáridos-proteína y/o complejos de polisacáridos-proteína-ácidos grasos.

En ciertas modalidades, los métodos se pueden utilizar para producir aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30 g/L aproximadamente 1 a aproximadamente 25 g/L, o aproximadamente 5 a aproximadamente 25 g/L del uno o más biosurfactantes.

En algunas modalidades, los subproductos de crecimiento microbiano incluyen otros metabolitos. Como se usa en la presente, 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 enzimáticos, biopolímeros, ácidos, solventes, gases, proteínas, péptidos, aminoácidos, alcoholes, pigmentos, 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 ciertas modalidades, el uno o más subproductos de crecimiento incluyen enzimas tal como, por ejemplo, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y/o ligasas. Los tipos y/o subclases específicas de enzimas de acuerdo con la presente invención también pueden incluir, pero no se limitan a, nitrogenasas, proteasas, amilasas, glucosidasas, celulasas, glucosidasas, glucanasas, galactosidasas, moannosidasas, sacaras, dextranasas, hidrolasas, metiltransferasas, fosforilasas, deshidrogenasas (por ejemplo, glucosa deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa), oxigenasas (por ejemplo, alcano oxigenasas, metano monooxigenasas, dioxigenasas), hidroxilasas (por ejemplo, alcano hidroxilasa), esterasas, lipasas, ligninasas, mananasas, oxidasas, lactasas, tirosinasas, enzimas de citocromo P450, peroxidasas (por ejemplo, cloroperoxidasa y otras haloperoxidasas) y lactasas.

En ciertas modalidades, el uno o más subproductos de crecimiento incluyen compuestos antibióticos, tal como, por ejemplo, aminoglucósidos, amilociclina, bacitracina, bacillaeno, bacilisina, bacilosocina, coralopironina A, difficidina, etnangien gramicidina, β -lactamas, liqueniformina, macrolactinsublancina, oxidifficidina, plantazolicina, ripostatina, espectinomycinina, subtilina, tirocidina y/o zwittermicina A. En algunas modalidades, un antibiótico también puede ser un tipo de biosurfactante.

En ciertas modalidades, el uno o más subproductos de crecimiento incluyen compuestos antifúngicos, tal como, por ejemplo, fengicina, surfactina, haliangicina, micobacilina, micosubtilina y/o bacilomicina. En algunas modalidades, un antifúngico también puede ser un tipo de biosurfactante.

En ciertas modalidades, el uno o más subproductos de crecimiento incluyen otros compuestos bioactivos, tal como, por ejemplo, butanol, etanol, acetato, acetato de etilo, lactato, acetoína, ácido benzoico, 2,3-butanodiol, beta-glucano, ácido indol-3-acético (IAA), lovastatina, auracina, kanosamina, reseoflavina, terpentecina, pentalenolactona, thuringiensina (β -exotoxina), polietilenos (PK), terpenos, terpenoides, fenil-propanoides, alcaloides, sideróforos, así como péptidos ribosómicamente y no ribosómicamente sintetizados, por nombrar algunos.

Productos basados en microbios

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

Un producto basado en microbios de la presente invención es simplemente el medio de fermentación que contiene los microorganismos, subproductos de crecimiento microbiano producidos por los microorganismos, cualquier nutriente residual y/o portador de anclaje de partículas residual. El producto basado en microbios se puede usar con o sin extracción y/o purificación.

Los microorganismos pueden estar en una forma activa o inactiva, o en forma de células vegetativas, biopelícula, esporas o una combinación de los mismos. Los productos basados en microbios se pueden usar sin estabilización, conservación ni almacenamiento adicionales. De manera ventajosa, el uso directo de estos productos basados en microbios preserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos no deseados y mantiene la actividad de los subproductos del crecimiento microbiano.

En una modalidad, el primer y segundo microorganismos se separan uno del otro después del co-cultivo. En una modalidad, el producto comprende una mezcla del primer y segundo microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento.

En una modalidad, la composición no comprende microorganismos vivos. En una modalidad, la composición no comprende para nada microorganismos, ni vivos ni inactivos.

En una modalidad, la composición comprende el uno o más subproductos de crecimiento microbiano separados del microorganismo que los produjo. Los subproductos de crecimiento pueden estar en una forma purificada o no purificada.

Los microorganismos, medio de nutriente y/o espuma que resulta del crecimiento microbiano se pueden remover del fermentador y/o recipiente de recolección y transferir a través de, por ejemplo, tuberías para su uso inmediato.

En otras modalidades, la composición (microbios, espuma y/o caldo) se puede colocar en recipientes de tamaño adecuado, 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 la ubicación de uso. De esta manera, los recipientes en los que se coloca la composición basada en microbios pueden ser, por ejemplo, de 1 galón a 1,000 galones (3.78 a 3785.41 litros) o más. En ciertas modalidades, los recipientes son de 2 galones (7.57 litros), 5 galones (18.92 litros), 25 galones (94.63 litros) o más.

Tras la cosecha de la composición basada en microbios de los recipientes de crecimiento, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto cosechado se coloca en recipientes

y/o se canaliza (o se transporta de otro modo para su uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, amortiguadores, portadores, otras composiciones basadas en microbios producidas en la misma instalación o diferentes, modificadores de viscosidad, conservadores, nutrientes para el crecimiento de microbios, agentes de rastreo, pesticidas y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

5 De manera ventajosa, de acuerdo con la presente invención, el producto basado en microbios puede comprender caldo en el cual se cultivaron los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, de 0% a 100%, de 10% a 90%, de 20% a 80% o de 30% a 70%, incluyendo todos los porcentajes entre estos.

10 Opcionalmente, el producto se puede almacenar antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferentemente corto. De esta manera, 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 modalidad preferida, el producto se almacena a o por debajo de una temperatura tal como, por ejemplo, 20°C, 15°C, 10°C, 5°C o 4°C, o menos. Si las células están presentes y en forma de esporas, el producto se almacena
15 y transporta, en una modalidad, a una temperatura baja, no superior a 15 °C, con el fin de evitar la germinación prematura.

Métodos de Uso

20 Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para una variedad de propósitos. En una modalidad, la composición se puede utilizar en agricultura. Por ejemplo, se proporcionan métodos en donde una composición producida de acuerdo con 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
25 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 modalidad, las composiciones de la presente pueden ser altamente ventajosas en el contexto de la industria del petróleo y gas. Cuando se aplican a un pozo de petróleo, pozo, formación subterránea o equipo utilizado para la recuperación de petróleo y/o gas, las composiciones producidas
30 de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en métodos para mejorar la recuperación de petróleo crudo; reducción de la viscosidad del petróleo; eliminación y dispersión de parafina de varillas, tuberías, revestimientos y bombas; prevención de la corrosión del equipo; recuperación de petróleo de arenas petrolíferas y pozos agotados; mejora de las operaciones de fracturación hidráulica como fluidos de fracturación; reducción de la concentración de H₂S en formaciones y petróleo crudo; y limpieza de
35 tanques, líneas de flujo y tuberías.

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

En una modalidad, las composiciones producidas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para limpiar equipos industriales. Por ejemplo, se proporcionan métodos en donde se aplica una composición al equipo de producción de petróleo tal como una varilla, tubería y/o tubería de revestimiento de pozo de petróleo, para eliminar hidrocarburos pesados, parafinas, asfaltenos, escamas 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 modalidad, las composiciones producidas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para mejorar la salud animal. Por ejemplo, se proporcionan métodos en donde la composición se puede aplicar a alimento o agua para animales, o mezclarse con el alimento o agua, y se utiliza para prevenir la propagación de enfermedades en las operaciones de ganado y acuicultura, reducir la necesidad de uso de antibióticos en grandes cantidades, así como para proporcionar proteínas suplementarias y otros nutrientes.

En una modalidad, las composiciones producidas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para prevenir el deterioro de los alimentos, prolongar la vida consumible de los alimentos y/o prevenir enfermedades transmitidas por alimentos. Por ejemplo, se proporcionan métodos en donde la composición se aplica a un producto alimenticio, tal como productos frescos, productos horneados, carnes y granos posteriores a la cosecha, para evitar el crecimiento microbiano no deseado.

Otros usos para las composiciones de la presente incluyen, pero no se limitan a, biofertilizantes, bioplaguicidas, biolixiviación, biorremediación de suelo y agua, adyuvantes farmacéuticos (para aumentar la biodisponibilidad de fármacos ingeridos por vía oral), productos cosméticos, control de crecimiento microbiano no deseado y muchos otros.

Producción local de productos basados en microbios

En modalidades 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 microbiano puede estar ubicada en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones basadas en microbios de alta densidad en cultivo por lotes, cuasicontinuo o continuo.

Las instalaciones de crecimiento microbiano distribuidas pueden estar ubicadas en el lugar donde se utilizará el producto basado en microbios. Por ejemplo, la instalación de crecimiento microbiano puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 milla (482.80, 402.33, 321.86, 241.40, 160.93, 120.70, 80.46, 40.23, 24.14, 16.09, 8.04, 4.82 o 1.60 km) de la ubicación de uso.

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

Debido a que el producto basado en microbios se genera localmente, sin recurrir a los procesos de estabilización, preservación, almacenamiento y transporte de microorganismos de la producción microbiana convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de células bacterianas y/o propágulos, lo que requiere un volumen menor del producto basado en microbios para su uso en la aplicación en el sitio o que permite aplicaciones microbianas de densidad mucho mayor donde sea necesario para lograr la eficacia deseada. Esto permite un biorreactor a menor escala (por ejemplo, un tanque de fermentación más pequeño y suministros más pequeños de material de arranque, nutrientes, agentes de control de pH), lo que hace que el sistema sea eficiente. La generación local del producto basado en 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 una ubicación específica. Las instalaciones de crecimiento microbiano proporcionan versatilidad de fabricación mediante la 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 de origen natural y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción de petróleo. Los microbios locales se pueden identificar con base en, por ejemplo, la tolerancia a la sal y capacidad de crecer a altas temperaturas.

De manera ventajosa, estas instalaciones de crecimiento microbiano proporcionan una solución al problema actual de depender de productores de tamaño industrial lejano cuya calidad de producto sufre debido a retrasos en el procesamiento aguas arriba, cuellos de botella de la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado y otras contingencias que inhiben la entrega y aplicación oportunas de, por ejemplo, un producto viable de alto recuento de células y el caldo y metabolitos asociados en los cuales las células se cultivan originalmente.

Los productos basados en microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en donde las células se han separado de metabolitos y

nutrientes presentes en el medio de crecimiento de fermentación. Los tiempos reducidos de transporte permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos en el momento y volumen según lo requiera la demanda local.

La producción y administración local, por ejemplo, dentro de las 24 horas posteriores a la fermentación da 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 entregar rápidamente productos basados en microbios.

EJEMPLOS

Se puede tener una mayor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas a partir de los siguientes ejemplos, proporcionados a modo de ilustración. Los siguientes ejemplos ilustran algunos de los métodos, aplicaciones, modalidades y variantes de la presente invención. No se van a considerar como limitantes de la invención. Se pueden realizar numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

Ejemplo 1 – Co-cultivo de *S. aurantiaca* y *A. venetianus* para la producción de Emulsan

A. venetianus se cultiva en un reactor a pequeña escala durante al menos 48 horas para producir un inóculo al 3.0%. *S. aurantiaca* se cultiva en un reactor de pequeña escala durante al menos 4 días para producir un inóculo al 1.0%. El inóculo de *S. aurantiaca* se puede muestrear y probar usando rayas de portaobjetos después de 3 días para probar la pureza.

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

Sacarosa	0.5 g/L a 2 g/L
Hidrolizado de caseína	5 a 15 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 a 1.0 g/L
K ₂ HPO ₄	0.01 a 0.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.01 a 0.5 g/L
CaCl ₂	0.01 a 0.5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 a 5 g/L
Elementos traza	0.5 a 3 g/L
Agua DI	Volumen restante a 1L

Adicionalmente, el medio nutriente incluye un portador de anclaje de partículas de grano fino que comprende celulosa (1.0 a 5.0 g/L) y/o harina de maíz (1.0 a 5.0 g/L).

Una solución base acuosa que comprende NaOH al 20% y/o una solución ácida acuosa que comprende ácido cítrico al 20% se alimentan en el reactor para ajustar y mantener el pH automáticamente a/en aproximadamente 6.6 a 7.0, o aproximadamente 6.8. Luego, se agrega un antiespumante basado en aceite (10 a 30 ml/L), tal como, por ejemplo, DG-959 (Organic Defoamer Group), y/o aceite de canola, para reducir la producción de espuma en el reactor. Se puede alimentar antiespumante adicional durante la fermentación según sea necesario para reducir la producción de espuma.

El cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 2 a 3 días. La temperatura se mantiene a aproximadamente 24°C; DO se mantiene a aproximadamente 50%; y la velocidad de flujo de aire se mantiene a aproximadamente 1 vvm.

Durante todo el cultivo, el reactor se alimenta con aceite de canola (6%, una vez cada 24 horas) y parafina líquida transparente (7%, después de 24 horas).

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

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

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Su, WT., et al. (2009). "Optimización de la producción de Emulsan de *A. venetianus* RAG-1 utilizando la metodología de superficie de respuesta". Appl. Microbiol. Biotech. 84:2, 271-279.