

PRODUCCIÓN DE ESPORAS FÚNGICAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO

SÓLIDO

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. serie núm. 63/399.460, presentada el 19 de agosto de 2022, que se incorpora en la presente descripción como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se dirige a métodos para producir esporas fúngicas mediante fermentación en estado sólido. La presente descripción se dirige además hacia la producción dirigida de las esporas fúngicas en relación con el cultivo de células fúngicas.

ANTECEDENTES

La producción de esporas fúngicas es industrialmente importante. Por ejemplo, las esporas fúngicas se pueden usar por su capacidad pesticida. Las esporas fúngicas se han producido convencionalmente por fermentación sumergida (SmF) en

medios acuosos, o por fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés). La fermentación en estado sólido generalmente incluye proporcionar células fúngicas en un ambiente húmedo sin o con un mínimo de agua que fluye libremente. Sin embargo, la operación SSF a gran escala sigue siendo un desafío.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos mejorados para producir esporas fúngicas.

SUMARIO

En un aspecto, un método para producir esporas fúngicas que utiliza fermentación en estado sólido (SSF) comprende etapas de combinar, en un recipiente de fermentación en estado sólido, esporas fúngicas y un sustrato sólido para producir un cultivo fúngico; someter el cultivo fúngico en el recipiente de fermentación en estado sólido a condiciones de fermentación en estado sólido; donde las condiciones de fermentación en estado sólido incluyen condiciones para la producción dirigida de esporas fúngicas adicionales por células fúngicas en relación con el cultivo de las células fúngicas; y recolectar las esporas fúngicas adicionales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las ventajas de la presente descripción se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y las figuras adjuntas en donde:

la Figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de productividad de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para diferentes sustratos sólidos, que incluyen agar de papa y dextrosa (PDA) ajustado a un pH de 10, y en condiciones de luz y oscuridad para los diferentes sustratos sólidos;

la Figura 2 es una gráfica que muestra los resultados del rendimiento de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para condiciones de fermentación sumergida (SmF) en comparación con las condiciones de fermentación en estado sólido (SSF);

la Figura 3 es una gráfica que muestra resultados de productividad de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para condiciones de pH alto y alto contenido de sal;

la Figura 4 es una gráfica que muestra resultados de rendimiento de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para condiciones alternativas de pH alto;

la Figura 5 es una gráfica que muestra los resultados de rendimiento de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para condiciones alternativas de pH alto adicionales;

la Figura 6 es una gráfica que muestra resultados de rendimiento de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para condiciones alternativas de alto contenido de sal;

la Figura 7 es una gráfica que muestra los resultados de rendimiento de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para diversos tamaños de sustrato sólido; y

la Figura 8 es una gráfica que muestra resultados adicionales de rendimiento de esporas para las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* para diversos tamaños de sustrato sólido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Aspectos de la presente descripción están dirigidos hacia métodos mejorados de producción de esporas fúngicas por fermentación en estado sólido (SSF). La producción de esporas fúngicas por fermentación en estado sólido, donde las células fúngicas se cultivan en un ambiente húmedo sin o con un mínimo de agua de flujo libre, ahora se reconoce por tener ciertas ventajas sobre la fermentación sumergida en medios acuosos. Por ejemplo, la producción de fermentación en estado sólido de esporas fúngicas puede tener menor requerimiento de energía, menor consumo de agua y mayor idoneidad para usar residuos sólidos y subproductos como materia prima/sustrato, en relación con la fermentación sumergida.

Sin embargo, antes de los aspectos de la presente descripción, los aspectos de la producción convencional de fermentación en estado sólido siguen siendo desafiantes. Por ejemplo, ciertos sustratos sólidos apilados tienden a tener una porosidad limitada y distribuida de manera desigual o espacio vacío dentro de los mismos, y esta condición dificulta el suministro de oxígeno suficiente para soportar la respiración de altas concentraciones de células fúngicas de cultivo saludable en todos los lugares dentro de uno o más

lechos empaquetados de sustrato sólido. Por lo tanto, uno o más aspectos de la presente descripción utilizan componentes más grandes, tales como piezas grandes de cáscara de soya, como el sustrato sólido, que puede permitir un mejor flujo de aire convectivo a través de uno o más lechos empaquetados de sustrato sólido. Además, al permitir un mejor suministro de oxígeno a las células fúngicas y al sustrato, la productividad y el rendimiento de las esporas pueden mejorarse por aspectos de la presente descripción. Ventajosamente, en uno o más aspectos, las partículas grandes de cáscara de soya pueden servir tanto como la única fuente de alimento como el único soporte para las células fúngicas, cuyo soporte puede denominarse soporte físico o soporte estructural. Además, la utilización de las partículas grandes de la cáscara de soya permite que el SSF se produzca dentro de una columna o torre, en comparación con las bandejas o bolsas poco profundas convencionales.

También puede ser deseable lograr una producción dirigida de las esporas en relación con el cultivo de células fúngicas. Es decir, mientras que la esporulación generalmente ocurre naturalmente al inicio de la inanición de nutrientes de las células fúngicas, uno o más aspectos de la presente descripción desencadenan la producción de esporas por las células fúngicas antes de la inanición de nutrientes. En otras

palabras, la producción de esporas se produce cuando las células fúngicas todavía tienen un suministro adecuado de nutrientes para el cultivo de estas. Las condiciones que conducen a esta producción de esporas se denominan en la presente descripción producción dirigida de las esporas en relación con el cultivo de las células fúngicas o como factores de selección. Como se describirá adicionalmente en la presente descripción, estas condiciones comprenden uno o más de pH y salinidad (es decir, presión osmótica). Esta forma de producción de esporas generalmente conduce a una mayor productividad y rendimiento de esporas, en relación con la espera de que la esporulación ocurra de forma natural al inicio de la inanición de nutrientes.

Las mejoras en la productividad y rendimiento de las esporas también son ventajosas en relación con las aplicaciones finales para las esporas. En este sentido, uno o más aspectos de la descripción están dirigidos hacia la utilización de las esporas recogidas dentro de un material cementoso, tal como concreto, para autorreparar grietas en el mismo.

La fermentación en estado sólido (SSF) incluye depositar un sustrato sólido en uno o más lechos, tal como dentro de un recipiente de fermentación en estado sólido. Antes o después de depositar el sustrato sólido, el sustrato

sólido es inoculado con otros componentes de un cultivo, que pueden denominarse un medio de cultivo, tales como microorganismos, agua y sal. En uno o más aspectos, el cultivo comprende hongos, cultivo que por lo tanto puede denominarse cultivo fúngico. En uno o más aspectos, una inoculación inicial del cultivo comprende esporas fúngicas. En uno o más aspectos, una inoculación inicial del cultivo comprende células fúngicas. En uno o más aspectos, una inoculación inicial del cultivo está sustancialmente desprovista de, o desprovista de, células fúngicas. En estos aspectos, las células fúngicas se producirían a partir de la germinación de las esporas fúngicas.

Cuando una inoculación inicial del cultivo comprende esporas fúngicas, una cantidad de inoculación inicial ilustrativa es aproximadamente $2,5 \times 10^5$ esporas fúngicas por gramo del sustrato sólido. Otras cantidades de inoculación inicial adecuadas incluyen de aproximadamente 1×10^4 a 1×10^6 , o de aproximadamente 1×10^3 a 1×10^8 , o de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^5 , esporas fúngicas por gramo del sustrato sólido. Cuando una inoculación inicial del cultivo comprende esporas fúngicas, las esporas fúngicas que son producidas posteriormente por las células fúngicas pueden denominarse esporas fúngicas adicionales.

Si bien gran parte de la descripción se enfoca en hongos y esporas fúngicas adecuados, es posible que ciertos otros microorganismos, tales como bacterias y esporas bacterianas, puedan utilizarse con los aspectos de fermentación en estado sólido descritos en la presente.

Como parte de un proceso de SSF, el cultivo depositado que comprende el sustrato sólido comprenderá un contenido de agua relativamente bajo en el sustrato. Además, se pueden controlar ciertas condiciones de un proceso de fermentación en estado sólido, tales como temperatura, humedad, luz, relación materia prima a cultivo y pH, para lograr una fermentación efectiva en estado sólido.

Como se sugirió anteriormente, en uno o más aspectos, el sustrato sólido puede caracterizarse por su tamaño. En uno o más aspectos, el sustrato sólido tiene un tamaño de $< 600\ \mu\text{m}$. En otros aspectos, el sustrato sólido tiene un tamaño de aproximadamente $600\ \mu\text{m}$ a $8\ \text{mm}$. En uno o más aspectos, el sustrato sólido tiene un tamaño de aproximadamente 600 a $850\ \mu\text{m}$, o de aproximadamente $850\ \mu\text{m}$ a $2\ \text{mm}$, o de aproximadamente 2 a $5,6\ \text{mm}$, o de aproximadamente $1\ \text{mm}$ a $8\ \text{mm}$, o de aproximadamente $1,5\ \text{mm}$ a $6\ \text{mm}$, o de aproximadamente $1\ \text{mm}$ a $4\ \text{mm}$, o de aproximadamente $3\ \text{mm}$ a $6\ \text{mm}$. En uno o más aspectos, el sustrato sólido tiene un tamaño de al menos $0,5\ \text{mm}$, o al menos $1\ \text{mm}$, o al menos $2\ \text{mm}$, o al menos $3\ \text{mm}$, o al menos $4\ \text{mm}$.

En uno o más aspectos, un sustrato más grande puede ofrecer ciertas mejoras, tales como al proporcionar una mayor porosidad de un lecho global de sustrato sólido para permitir que el aire pase a través del mismo. Las dimensiones de tamaño generalmente se refieren a una longitud del sustrato sólido, que generalmente será la dimensión más grande del sustrato sólido. Los tamaños de partícula de un sustrato sólido pueden determinarse mediante una malla ASTM estándar. Es decir, el tamaño del sustrato sólido se puede medir pasando el sustrato sólido a través de una malla ASTM estándar. Las partículas del sustrato sólido que pueden pasar a través de una malla de mayor tamaño pero no a través de una malla de menor tamaño pueden definir un rango de para el tamaño del sustrato sólido, donde los tamaños de malla se refieren a la distancia de alambre a alambre en la malla. Por ejemplo, el rango superior de 5,6 mm para uno o más aspectos se refiere a la malla ASTM núm. 3 1/2.

Los sustratos sólidos adecuados ilustrativos incluyen cáscaras de soya, cáscaras de arroz, cáscaras de cebada, cáscaras de trigo, cascarillas de grano, cáscaras de grano, cáscaras de maíz, cáscaras de coco, vainas de frijol, otra biomasa agrícola, y mezclas de estas. Estos pueden incluir piezas de estos materiales (p. ej., trozos de cáscara de maíz, trozos de cáscara de coco, trozos de vaina de frijol). Especialmente preferidos son los sustratos de gran

tamaño de estos sustratos, particularmente cáscaras de soya grandes.

Cuando se utilizan grandes piezas de cáscara de soya, estas grandes piezas de cáscara de soya generalmente crean grandes vacíos en el volumen de sustrato SSF. Estos grandes vacíos permiten varias ventajas que incluyen una o más de permitir un buen flujo de aire convectivo a través del lecho de sustrato para un suministro efectivo de oxígeno, permitiendo la eliminación efectiva del calor generado por el metabolismo celular, y permitiendo el control y ajuste del contenido de humedad en el lecho de sustrato basado en el control de la humedad del aire entrante. Estas grandes piezas de cáscara de soya generalmente tendrán formas curvas, lo que ayuda aún más en la creación de los vacíos. Las grandes piezas de cáscara de soya como sustrato sólido también son capaces de absorber el agua necesaria y otros compuestos solubles y nutrientes, donde estén presentes.

El sustrato sólido puede caracterizarse por una porosidad, que puede denominarse porosidad inicial. Esta porosidad generalmente se refiere a la porosidad global de un lecho del sustrato sólido. En uno o más aspectos, la porosidad inicial de un lecho del sustrato sólido puede ser de aproximadamente 90 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 75 %, o aproximadamente 65 %. En uno o más

aspectos, la porosidad inicial de un lecho del sustrato sólido puede ser de al menos 65 %, o al menos 75 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %. Como se mencionó anteriormente, estas porosidades pueden ser los porcentajes iniciales, aunque las porosidades también pueden caracterizarse por porcentajes posteriores. A medida que las células se cultivan, el tamaño del lecho puede tender a encogerse debido a la compresión del peso y al enredo de las células en cultivo. Como tal, en ciertos aspectos, la porosidad posterior de un lecho del sustrato sólido puede ser de aproximadamente 90 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 75 %, o aproximadamente 65 %. En uno o más aspectos, la porosidad posterior de un lecho del sustrato sólido puede ser de al menos 65 %, o al menos 75 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %. La porosidad inicial puede diseñarse para mantener la porosidad posterior en o por encima de un valor deseado.

Como se mencionó anteriormente, el cultivo depositado que comprende el sustrato sólido comprenderá algún contenido inicial de agua en el sustrato sólido. En uno o más aspectos, el contenido inicial de agua puede diseñarse para la esporulación dirigida, en lugar del cultivo celular. Es decir, el contenido inicial de agua se puede adaptar para dar los mayores rendimientos de esporas. En uno o más aspectos, una

relación de agua a sustrato sólido puede ser de aproximadamente 0,5 : 1 a 3 : 1, o desde aproximadamente 1 : 1 a 2,5 : 1, o desde aproximadamente 1,25 : 1 a 2,25 : 1, o desde aproximadamente 1,5 : 1 a 2 : 1, donde las proporciones se refieren a ml de agua por gramo de sustrato sólido. En uno o más aspectos, una relación de agua a sustrato sólido puede ser o aproximadamente 0,5 : 1, aproximadamente 1 : 1, o aproximadamente 1,5 : 1, o aproximadamente 2 : 1, donde las proporciones se refieren a ml de agua por gramo de sustrato sólido.

En uno o más aspectos, el sustrato sólido (p. ej., partículas grandes de cáscara de soya) puede servir tanto como fuente de alimento y como único soporte físico. Es decir, una torre o columna de fermentación en estado sólido puede estar sustancialmente desprovista de una fuente de alimento adicional distinta del sustrato sólido. La fuente de alimento también puede denominarse fuente orgánica o fuente de carbono. En uno o más aspectos, una torre o columna de fermentación en estado sólido puede estar sustancialmente desprovista de un soporte o portador inerte adicional distinto del sustrato sólido.

En uno o más aspectos, la fermentación en estado sólido puede ocurrir en una columna o torre. Es decir, un recipiente de fermentación en estado sólido puede ser una

columna o torre. Dicho de otra manera, un paso de combinar las células fúngicas con el sustrato sólido bajo las condiciones de fermentación en estado sólido puede darse en una columna o torre. El experto en la técnica generalmente sabrá cómo adaptar las propiedades de una columna o torre para lograr resultados adecuados. Las propiedades ilustrativas incluyen tipos de bandejas, número de bandejas, capacidad de la bandeja, altura del lecho, altura de la columna, diámetro de la columna y volumen total.

En uno o más aspectos, una columna o torre puede incluir un único lecho del cultivo depositado. En otros aspectos, particularmente donde se desea una columna o torre más alta, las columnas o torres pueden incluir una serie de bandejas donde cada bandeja incluirá generalmente cultivo depositado. Las bandejas pueden estar hechas de diferentes materiales, como metal y plástico. Las bandejas suelen tener la parte superior abierta y la parte inferior perforada, y normalmente se apilan una encima de otra con un espacio entre cada par de bandejas para aumentar la disponibilidad de aire para el cultivo. Las bandejas son lechos estáticos, lo que significa que generalmente no se mezclarán. Se puede proporcionar aire a la columna o torre, que puede circular alrededor de las bandejas con humedad y temperatura

controladas. La columna o torre generalmente estará a presión ambiente.

La adición de aire también puede denominarse suministro de flujo de aire convectivo hacia arriba a través del sustrato sólido para así suministrar oxígeno a las células fúngicas del cultivo depositado. Como se mencionó, el flujo de aire convectivo puede tener un % de humedad predeterminado para controlar la humedad del recipiente de fermentación en estado sólido a una humedad diana para las condiciones de fermentación en estado sólido. Este control de la humedad puede incluir mezclar una corriente humidificada con aire ambiente a relaciones de flujo ajustables en función de la humedad diana. La corriente humidificada puede incluir de aproximadamente 90 % a 100 %, o aproximadamente 90 % a 95 %, o aproximadamente 95 % a 100 %, humedad. La corriente humidificada puede incluir aproximadamente 100 %, o aproximadamente 99 %, o aproximadamente 95 %, de humedad. La corriente humidificada puede incluir al menos 95 %, o al menos 98 %, o al menos 99 %, humedad. La humedad de la corriente humidificada se puede lograr pasando el flujo a través de una columna humidificada. El contenido de humedad deseado puede diferir para el cultivo celular y para la esporulación. Tener la capacidad de controlar y ajustar, de manera relativamente

homogénea, el contenido de humedad usando un flujo de aire con diferentes niveles de humedad es por lo tanto altamente ventajoso.

Dentro del proceso de fermentación en estado sólido, como en la torre o columna, el cultivo se someterá a condiciones de fermentación tales que el sustrato sólido del cultivo será consumido por las células fúngicas del cultivo. Como se menciona en la presente descripción, este consumo y las condiciones generalmente están destinadas a dirigirse a la esporulación en lugar del cultivo celular. En uno o más aspectos, el sustrato sólido es consumido casi completamente por las células fúngicas dentro de un proceso de fermentación en estado sólido antes de recolectar las esporas de las mismas. En uno o más aspectos, al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 99 %, del sustrato sólido inicial es consumido por las células fúngicas antes de recolectar las esporas de las mismas. En uno o más aspectos, de 80 % a 100 %, o de 90 % a 100 %, o de 90 % a 95 %, del sustrato sólido inicial es consumido por las células fúngicas antes de recolectar las esporas de las mismas.

El proceso de fermentación en estado sólido debe ser provisto de nutrientes adecuados para el cultivo depositado. En uno o más aspectos, estos nutrientes se pueden proporcionar a través de una solución de nutrientes minerales con el sustrato

sólido antes de combinarlos con las esporas fúngicas. En uno o más aspectos, el propio sustrato sólido puede contener nutrientes adecuados o suficientes para el cultivo celular y la producción de esporas.

Un ejemplo de una solución nutritiva para añadir al sustrato sólido es 0,02 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 g/l K_2HPO_4 , 0,0025 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 0,002 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, donde la base es 1 l de la solución nutritiva. Otro ejemplo de una solución nutritiva para añadir es 14 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4 g/l urea, 3,1 g/l KH_2PO_4 , 1,8 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 1 ml/l de una solución de oligoelementos. Una solución de oligoelementos puede tener la siguiente composición (por l de la solución de oligoelementos): 2,5 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 1 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Como se mencionó anteriormente, no es necesario añadir todos o alguno de los nutrientes anteriores, dependiendo del sustrato sólido usado, el cual puede contener nutrientes adecuados o suficientes para el cultivo celular y la producción de esporas en la SSF.

Como se menciona en la presente descripción, con el fin de dirigirse a la esporulación, un método puede comprender una etapa de desencadenar la producción de esporas cuando las células todavía tienen un suministro adecuado de nutrientes. Este aspecto de las células fúngicas que tienen un suministro

adecuado de nutrientes puede denominarse el método que carece de, o sustancialmente desprovisto de, un paso de inanición de nutrientes. Sin embargo, durante el cultivo, las células podían agotar naturalmente ciertos nutrientes que originalmente se proporcionaron. En cualquier caso, un objetivo de un proceso de fermentación en estado sólido descrito en la presente es la producción dirigida de esporas.

En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido está desprovisto de, o sustancialmente desprovisto de, una fuente de carbono adicional distinta del sustrato sólido. En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido está desprovisto de, o sustancialmente desprovisto de, un suplemento de glucosa. En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido está desprovisto de, o sustancialmente desprovisto de, una fuente de nitrógeno adicional distinta del sustrato sólido.

Con respecto a las especies para los microorganismos y esporas que se utilizarán en el proceso de fermentación en estado sólido descrito en la presente, los microorganismos y esporas adecuados pueden cribarse y elegirse en relación con las características del proceso de fermentación en estado sólido descrito en la presente. Es decir, los microorganismos y esporas adecuados pueden cribarse y elegirse en relación con mejorar la esporulación, pero no el cultivo celular fúngico. La

idoneidad de ciertos microorganismos y esporas también puede elegirse basado en una aplicación final, tal como cuando las esporas van a ser utilizadas dentro de un material cementoso para su autorreparación. Si bien gran parte de la descripción se centra en esporas fúngicas adecuadas, es posible que ciertas esporas bacterianas puedan utilizarse de acuerdo con las funciones descritas en la presente.

En aspectos de la descripción, las especies adecuadas para las esporas fúngicas incluyen hongos alcalofílicos y/o alcalotolerantes. En aspectos de la descripción, las especies adecuadas para los microorganismos y esporas fúngicas incluyen *Scopulariopsis brevicaulis*, *Purpureocillium lilacinum*, *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus nidulans* y combinaciones de estas. Con referencia a la Colección de cultivo USDA-ARS (NRRL), los ejemplos incluyen *Aspergillus nidulans* NRRL 187, *Scopulariopsis brevicaulis* NRRL 1100, *Myrothecium verrucaria* NRRL 2003, y *Purpureocillium lilacinum* NRRL 895.

En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido puede someterse a la producción dirigida de las esporas en relación con el cultivo de las células fúngicas. Esta producción dirigida de esporas también puede denominarse como sometiendo el proceso de fermentación en estado sólido a uno o más factores de selección que se dirigen y desencadenan

aún más la producción de esporas. Esta producción dirigida de esporas también puede denominarse esporulación inductora. Los factores de selección ilustrativos, que también pueden denominarse condiciones de esporulación o influencias de selección, incluyen pH alto y sal/osmolalidad alta. Los microorganismos y esporas particulares que se utilizan pueden conducir a condiciones particulares de esporulación para mejorar la esporulación dentro del proceso de fermentación en estado sólido.

En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter un cultivo a un pH alto. En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter un cultivo a un pH de aproximadamente 10 a aproximadamente 11, o de aproximadamente 9 a aproximadamente 11, o de aproximadamente 9 a aproximadamente 10. En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter un cultivo a un pH de aproximadamente 9, o aproximadamente 10, o aproximadamente 11. En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter un cultivo a un pH mayor a 9, o mayor a 10.

En uno o más aspectos, estos valores altos de pH pueden ser relativos a un medio inicial previo a combinar el

medio inicial con sustrato sólido del cultivo. Esto puede denominarse ajuste inicial del pH. Es decir, un medio inicial puede ser una solución acuosa que comprende una cierta cantidad de una base con el fin de lograr un pH deseado para el medio inicial. El medio inicial puede entonces combinarse con el sustrato sólido y otros componentes del cultivo. Las condiciones del proceso SSF también pueden adaptarse para mantener generalmente estos valores de pH, u otros valores de pH deseados, durante un periodo de tiempo deseado del proceso SSF. En uno o más aspectos, el pH podría ajustarse durante SSF para mantener o lograr estos valores de pH altos. Como se mencionó anteriormente, en uno o más aspectos, el pH podría ajustarse, ya sea inicialmente o posteriormente, mediante una solución base. Las soluciones base adecuadas incluyen una solución de hidróxido de sodio (NaOH) o una solución de hidróxido de potasio (KOH). Una solución base ilustrativa es NaOH 0,1 M.

En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter un cultivo a una alta salinidad, que también puede denominarse presión osmótica u osmolalidad. La salinidad se puede dar en g/l de NaCl, que puede adaptarse a otras sales que se pueden usar o medir. En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado

sólido incluye someter el cultivo a una salinidad de aproximadamente 10 g/l de NaCl a aproximadamente 25 g/l de NaCl, o de aproximadamente 10 g/l de NaCl a aproximadamente 20 g/l de NaCl, o de aproximadamente 15 g/l de NaCl a aproximadamente 20 g/l de NaCl. En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter el cultivo a una salinidad de aproximadamente 10 g/l de NaCl, o aproximadamente 15 g/l de NaCl, o aproximadamente 20 g/l de NaCl. En uno o más aspectos, un factor de selección para un proceso de fermentación en estado sólido incluye someter el cultivo a una salinidad de aproximadamente 10 g/l de NaCl, o aproximadamente 15 g/l de NaCl, o aproximadamente 20 g/l de NaCl. Estos valores de salinidad generalmente se medirán a la temperatura y presión del proceso de fermentación en estado sólido.

En uno o más aspectos, estos altos valores de salinidad pueden ser relativos al medio inicial previo a combinar el medio inicial con sustrato sólido del cultivo. Esto puede denominarse ajuste inicial de salinidad. Las condiciones del proceso SSF también pueden adaptarse para mantener estos altos valores de salinidad durante un periodo de tiempo deseado del proceso SSF. En uno o más aspectos, la salinidad podría ajustarse durante SSF para mantener o lograr estos altos

valores de salinidad. En uno o más aspectos, la salinidad podría ajustarse, ya sea inicialmente o posteriormente, mediante una solución salina. Las sales adecuadas para una solución líquida del mismo incluyen cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), nitrato de sodio (NaNO_3), nitrato de potasio (KNO_3), sulfato de sodio, sulfato de potasio, fosfato de sodio y fosfato de potasio.

El proceso de fermentación en estado sólido puede caracterizarse basado en la productividad de esporas (p. ej., en la unidad de número de esporas producidas por l de lecho SSF/volumen de reactor por día) y/o rendimiento (p. ej., en la unidad de número de esporas producidas por g de sustrato sólido usado).

En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido logra una productividad de esporas de al menos 2×10^9 , o al menos 1×10^{10} , o al menos 5×10^{10} , esporas/día l. En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido logra una productividad de esporas de aproximadamente 2×10^9 a 8×10^{10} , o de aproximadamente 5×10^9 a 5×10^{10} , o de aproximadamente 1×10^{10} a 5×10^{10} , esporas/día l.

En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido logra un rendimiento de al menos 5×10^8 , o al menos 8×10^8 , o al menos 1×10^9 , esporas/g sustrato sólido.

En uno o más aspectos, un proceso de fermentación en estado sólido logra un rendimiento de aproximadamente 5×10^8 a 2×10^9 , o de aproximadamente 8×10^8 a 1×10^9 , o de aproximadamente 1×10^9 a 2×10^9 , esporas/g sustrato sólido.

Tras el cultivo de células fúngicas dentro de un cultivo fúngico sobre sustrato sólido húmedo bajo condiciones de fermentación en estado sólido (SSF), se pueden recolectar las esporas fúngicas producidas a partir de las mismas. Como se mencionó anteriormente, las esporas fúngicas recolectadas pueden denominarse esporas fúngicas adicionales ya que el cultivo inicial puede incluir esporas fúngicas iniciales. En uno o más aspectos, la una o más etapas particulares relacionadas con la recolección de las esporas generalmente no incluyen añadir más agua. La recolección de esporas del sustrato sólido SSF puede incluir combinar un líquido hidrófobo con el sustrato sólido SSF para la recolección de esporas del mismo. Se pueden usar muchas sustancias y mezclas adecuadas para el líquido hidrófobo. Los materiales ilustrativos para el líquido hidrófobo incluyen aceites, ácidos grasos libres y grasas fundidas. Estas incluyen soluciones y mezclas de estas.

Después de añadir un líquido hidrófobo al sustrato sólido SSF, se puede usar la mezcla para liberar las esporas de la biomasa fúngica, lo que puede incluir la creación de

cizallamiento. Las esporas liberadas generalmente se dividirán en la fase oleosa. Después de que se detiene la mezcla, los sólidos más grandes y no hidrófobos (es decir, el sustrato y la biomasa restantes) pueden ser eliminados. Esta eliminación puede ser por filtración (p. ej., malla de cribado) o permitiendo que estos materiales se asienten en el fondo. Donde se permite que estos materiales se asienten en el fondo, puede ocurrir una primera recolección para estos materiales más grandes sin recolectar muchas esporas. Las esporas serán más pequeñas que estos materiales más grandes y, por lo tanto, se asentarán mucho más lentamente que las piezas más grandes de cualquier sustrato y biomasa restantes. Entonces puede ocurrir una segunda recolección para la fase oleosa que contiene las esporas. Algunas partículas más pequeñas de la célula y los restos del sustrato podrían permanecer en la fase oleosa recolectada, lo que puede ser tolerable para ciertas aplicaciones finales. En otros aspectos, estas partículas más pequeñas de la célula y los restos del sustrato podrían separarse aún más de las esporas.

Después de la recolección de un producto que incluye esporas dentro de un líquido hidrófobo, el producto recolectado puede concentrarse aún más en relación con la concentración de esporas. Esto puede incluir permitir que las esporas del producto recolectado se asienten aún más en

el fondo, lo que puede denominarse como dejar reposar el producto recolectado. La etapa de sedimentación puede ocurrir en una condición no mezclada, que también puede denominarse como la etapa de permitir la sedimentación que se produce después de la etapa de mezcla. Entonces, después de permitir que se asienten, se puede eliminar la capa superior de líquido hidrófobo a partir de la cual se habían asentado las esporas, que puede denominarse aceite aclarado. Esto terminará con un líquido inferior restante (p. ej., aceite) con una concentración de esporas aún mayor. El uso de la sedimentación y la cantidad de sedimentación a usar, puede depender de una concentración deseada para una suspensión de esporas en relación con una aplicación prevista para el producto.

Como se mencionó anteriormente, una aplicación final adecuada para las esporas recogidas es dentro de un material cementoso, como el concreto. Las esporas pueden proporcionarse dentro de un sustrato poroso, donde el sustrato poroso que comprende los poros puede estar dentro del material cementoso. Las esporas que se encuentran dentro del material cementoso pueden germinar con el fin de volver al cultivo vegetativo como células vegetativas, las cuales pueden entonces formar depósitos sólidos por biomineralización para reparar una o más grietas dentro de los materiales cementosos.

Si bien los aspectos de la descripción se analizan anteriormente, aquí se proporcionan ciertos aspectos ilustrativos.

Aspecto 1. Un método para producir esporas fúngicas que utiliza fermentación en estado sólido (SSF), el método comprende etapas de combinar, en un recipiente de fermentación en estado sólido, esporas fúngicas y un sustrato sólido para producir un cultivo fúngico; someter el cultivo fúngico en el recipiente de fermentación en estado sólido a condiciones de fermentación en estado sólido; donde las condiciones de fermentación en estado sólido incluyen condiciones para la producción dirigida de esporas fúngicas adicionales por células fúngicas en relación con el cultivo de las células fúngicas; y recolectar las esporas fúngicas adicionales.

Aspecto 2. El método del Aspecto 1, donde las células fúngicas son proporcionadas por el cultivo fúngico, donde las células fúngicas y las esporas fúngicas son de una especie seleccionada de *Scopulariopsis brevicaulis*, *Purpureocillium lilacinum*, *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus nidulans*, y combinaciones de estas.

Aspecto 3. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde las condiciones para la producción dirigida

de esporas fúngicas adicionales incluyen someter el cultivo fúngico a un pH de aproximadamente 10 a aproximadamente 11.

Aspecto 4. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde las condiciones de fermentación en estado sólido incluyen las células fúngicas que tienen un suministro adecuado de nutrientes para el cultivo de estas.

Aspecto 5. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde las condiciones para la producción dirigida de esporas fúngicas adicionales incluyen someter el cultivo fúngico a una salinidad mayor que 10 g/l de NaCl.

Aspecto 6. El método del Aspecto 5, donde la salinidad es de aproximadamente 10 g/l de NaCl a aproximadamente 20 g/l de NaCl.

Aspecto 7. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el sustrato sólido se selecciona de cáscaras de soya, cáscaras de arroz, cáscaras de cebada, cáscaras de trigo, cascarillas de grano, cáscaras de grano, cáscaras de maíz, cáscaras de coco, vainas de frijol, y mezclas de estas.

Aspecto 8. El método del Aspecto 7, donde el sustrato sólido son las cáscaras de soya, donde las cáscaras de soya tienen un tamaño de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 5,6 mm.

Aspecto 9. El método del Aspecto 7, donde el sustrato sólido son las cáscaras de soya, donde las cáscaras de soya tienen un tamaño de aproximadamente 850 μm a aproximadamente 2 mm.

Aspecto 10. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde las condiciones de fermentación en estado sólido incluyen suministrar flujo de aire convectivo hacia arriba a través del cultivo fúngico para suministrar de esta manera oxígeno a las células fúngicas.

Aspecto 11. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el método logra un rendimiento de las esporas fúngicas adicionales de aproximadamente 5×10^8 a 2×10^9 esporas/g sustrato sólido.

Aspecto 12. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el sustrato sólido tiene una porosidad de al menos 75 %.

Aspecto 13. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el recipiente de fermentación en estado sólido es una columna o torre.

Aspecto 14. El método del Aspecto 4, donde el suministro adecuado de nutrientes es proporcionado por una solución de nutrientes minerales.

Aspecto 15. El método del Aspecto 10, donde el flujo de aire convectivo tiene una humedad de

aproximadamente 95 % a 100 % para proporcionar humedad al recipiente de fermentación en estado sólido.

Aspecto 16. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el recipiente de fermentación en estado sólido está sustancialmente desprovisto de un soporte o portador inerte adicional distinto del sustrato sólido, donde el recipiente de fermentación en estado sólido está sustancialmente desprovisto de una fuente de carbono adicional distinta del sustrato sólido, y donde el recipiente de fermentación en estado sólido está sustancialmente desprovisto de una fuente de nitrógeno adicional distinta del sustrato sólido.

Aspecto 17. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el sustrato sólido incluye agua adicional proporcionada en una relación del agua adicional (en ml) al sustrato sólido (en gramos) de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2,5 : 1.

Aspecto 18. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el cultivo fúngico incluye una concentración de aproximadamente 1×10^4 a 1×10^6 de las esporas fúngicas por gramo del sustrato sólido.

Aspecto 19. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el sustrato sólido es consumido

sustancialmente en su totalidad por las células fúngicas antes de la etapa de recolección.

Aspecto 20. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende además una etapa de añadir las esporas fúngicas adicionales de la etapa de recolección a un material cementoso para reparar una o más grietas dentro del material cementoso.

A la luz de lo anterior, debe apreciarse que la presente invención avanza en la técnica al proporcionar un método mejorado de producción de esporas fúngicas por fermentación en estado sólido. Aunque aspectos particulares de la invención se han descrito en detalle en la presente descripción, debe apreciarse que la invención no se limita a los mismos o, por lo tanto, en la medida en que las variaciones de la invención en la presente descripción serán fácilmente apreciadas por los expertos en la técnica. El alcance de la invención se apreciará a partir de las reivindicaciones a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* en condiciones de oscuridad y pH 10

Se mantuvo un cultivo de *Scopulariopsis brevicaulis* en placas Petri de 9 cm que contenían aproximadamente 25 ml de 40 g/l de agar de papa y dextrosa (PDA). También se usaron placas Petri para la evaluación de materiales de soya como sustrato de cultivo. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Un sistema fue el control, con *S. brevicaulis* cultivándose en 40 g/l de PDA a pH 7, donde las células se cultivaron y esporularon en el laboratorio constantemente iluminado. Los otros 6 sistemas se dividieron en 3 pares, donde cada par tenía 1 sistema mantenido en la condición de luz y 1 sistema mantenido dentro de una caja oscura. Los 3 pares fueron placas Petri que contenían (1) 15 g/l de agar simple y 40 g/l de cáscara de soya (SH), (2) 15 g/l de agar simple y 40 g/l de melaza de soya (SM), y (3) 40 g/l de PDA ajustado a pH 10. Después de la inoculación, las placas se dejaron para cultivo fúngico y esporulación durante 14 días. Después se recolectaron las esporas. La productividad de esporas de estos sistemas se reporta como el número de esporas producidas por cm² del área de superficie de la placa de agar. Los resultados de la productividad de

las esporas se resumen en la Figura 1. La oscuridad no afectó la productividad de las esporas en los 3 pares de comparación. La condición de pH 10 dio una productividad de esporas significativamente mayor que los sistemas de pH 7, con células siendo cultivadas y esporulando en PDA. Se confirmó la misma conclusión en matraces de SSF con SH como sustrato, como se describe a continuación en la presente descripción, para corroborar la productividad mejorada de esporas cuando se usó pH alto para promover la esporulación.

Ejemplo 2 - Esporas de *S. brevicaulis* en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF) comparadas con condiciones de fermentación sumergida (SmF)

Los experimentos de fermentación sumergida (SmF) se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml triplicados que contenían 80 ml de agua, 10 g de SH, 2 g de glucosa, 0,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de K_2HPO_4 , 0,025 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 0,02 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se cubrieron los matraces con algodón en láminas de estameña, se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min, y después de enfriarse a temperatura ambiente, se inocularon con $2,5 \times 10^5$ esporas/g de SH. El cultivo se cultivó en un agitador funcionando a 250 rpm y 25 °C. Se tomaron muestras de cada matraz los días 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14

y 21 días para contar las esporas. Cada muestra se contó tres veces. El perfil de producción de esporas en SmF se desarrolló de manera adecuada.

Los experimentos de SSF se realizaron en 21 matraces Erlenmeyer (250 ml) que contenían 15 ml de agua, 10 g de SH y 10 % de todos los demás ingredientes en los experimentos SmF anteriores. Después del autoclave y enfriamiento, los sistemas de SSF se inocularon con $2,5 \times 10^5$ esporas/g de SH, igual que para los matraces de SmF. Se tomaron tres matraces como muestras de desecho los días 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días para el conteo de esporas, siguiendo el mismo procedimiento para los sistemas de SmF.

En la Figura 2 se muestran los perfiles temporales del rendimiento de esporas de *S. brevicaulis* (número de esporas/g de SH) obtenidos en estos sistemas de SSF y SmF con SH como sustrato. El sistema de SSF no produjo esporas en los dos primeros días, produjo esporas casi linealmente durante el Día 4 al Día 8, y comenzó a estabilizarse después. El rendimiento de esporas durante el Día 2 al Día 8 siguió la ecuación lineal de mejor ajuste: Rendimiento de esporas = $-4,54 \times 10^8 + (1,99 \times 10^8) \times \text{Tiempo (días)}$ ($R^2 = 0,98$). El rendimiento máximo de esporas alcanzado el Día 14 fue $(1,33 \pm 0,02) \times 10^9$ esporas/g de SH. El sistema de SmF no produjo esporas durante aproximadamente 4 días y produjo esporas casi

linealmente después. El rendimiento de esporas durante el Día 6 al Día 21 se puede describir mediante la ecuación: $\text{Rendimiento de esporas} = -7,62 \times 10^7 + (4,39 \times 10^7) \times \text{Tiempo (día)}$ ($R^2 = 0,98$). La producción diaria de esporas en SmF, es decir, $4,39 \times 10^7$ esporas/ (g de SH-día), fue solo aproximadamente 22 % de la de la SSF, es decir, $1,99 \times 10^8$ esporas/(g SH-día). El rendimiento de esporas del SmF fue $(5,49 \pm 0,07) \times 10^8$ esporas/g de SH en el Día 14 y $(8,27 \pm 0,09) \times 10^8$ esporas/g de SH en el Día 21, mucho menor que $(1,17 \pm 0,01) \times 10^9$ esporas/g de SH alcanzadas en la SSF para el Día 8.

De lo anterior, se puede concluir que la SSF ofreció mayor producción de esporas de *S. brevicaulis* que SmF.

Ejemplo 3 - Esporas de *S. brevicaulis* en condiciones de pH alto y alto contenido de sal

El efecto positivo de pH alto y alto contenido de sal en la producción de esporas de *S. brevicaulis* se mostró mediante un ejemplo con placas de agar Petri. Para los experimentos con placas de agar, se compararon 4 sistemas. Un sistema fue el control con 40 g/l de PDA a pH 7. También se prepararon otros dos sistemas con 40 g/l de PDA, pero a uno se le añadió 15 g/l de sal NaCl (aproximadamente una mitad

del nivel de salinidad del agua de mar), y el otro se ajustó a pH 10 (sin adición de NaCl) con NaOH 0,1 M. Todos estos sistemas se mantuvieron en el laboratorio constantemente iluminado. El cuarto sistema tenía el mismo PDA a pH 10 pero se mantuvo en un cajón oscuro. En la Figura 3 se comparan los valores de productividad de esporas de estos 4 sistemas. El alto pH 10 y, en particular, la condición de alta sal dieron como resultado una producción de esporas significativamente mayor.

Ejemplo 4 - Esporas de *S. brevicaulis* en condiciones alternativas de pH alto

El efecto positivo del pH alto sobre la producción de esporas de *S. brevicaulis* se mostró mediante matraces SSF. Los sistemas de matraz de SSF se prepararon de la misma manera que se describió en el Ejemplo 2 anterior, excepto para el ajuste del pH. Se evaluó el efecto del pH sobre el rendimiento de esporas para los matraces de SSF. La solución acuosa de glucosa y sales se ajustó a pH 5,5 (control) y pH 10, respectivamente, usando NaOH 0,1 M antes de añadirse a SH y realizar el autoclave, y los rendimientos de esporas se midieron y compararon en los Días 4, 8, y 14, con los resultados mostrados en la Figura 4.

Ejemplo 5 - Esporas de *S. brevicaulis* en otras condiciones alternativas de pH alto

En un ejemplo adicional, los sistemas de matraz de SSF se prepararon como se describe en el Ejemplo 4, excepto que el pH de la solución acuosa se ajustó a 5,5 (control), 9 y 11, respectivamente, y los rendimientos de esporas solo se midieron en el Día 14. Los resultados del rendimiento de esporas se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 6 - Esporas de *S. brevicaulis* en condiciones alternativas con alto contenido de sal

El efecto positivo del alto contenido de sal sobre la producción de esporas de *S. brevicaulis* se mostró mediante matraces de SSF. Los sistemas de matraz de SSF se prepararon de la misma manera que se describió en el Ejemplo 2 anterior, excepto para el ajuste de sal. Para el efecto de adición de NaCl evaluado con los matraces de SSF, se compararon los sistemas sin adición de NaCl (control) y con la adición de 0,15 g de NaCl (correspondiente a una concentración de 10 g/l en los 15 ml de agua añadidos). Los rendimientos de esporas medidos en el Día 14 de estos dos sistemas se muestran en la Figura 6. Si bien el rendimiento promedio de esporas del sistema de 10 g/l de NaCl fue mayor que el del sistema sin adición de NaCl, los dos sistemas no presentaron una diferencia

estadísticamente significativa ($p = 0,17 > 0,05$), en parte debido a la gran desviación estándar en el rendimiento de esporas del sistema de 10 g/l de NaCl. Por otro lado, el efecto de 15 g/l de NaCl fue muy significativo en los experimentos realizados con PDA en placas Petri (como se analizó anteriormente en el Ejemplo 3 y se muestra en la Figura 3). Los resultados indicaron que una alta concentración de sal puede mejorar significativamente la producción de esporas de SSF y la concentración de sal preferida para añadir puede ser mayor a 10 g/l, con 15 g/l en el Ejemplo 3 (aproximadamente la mitad de la concentración en agua de mar) brindando una mejora más significativa.

Ejemplo 7 - Esporas de *S. brevicaulis* relativas a diversos tamaños de sustrato sólido

El efecto del tamaño de partícula de SH sobre la producción de esporas se analizó para dos lotes de experimentos realizados en matraces de SSF (similar al Ejemplo 2 anterior). Las partículas de SH obtenidas se separaron en 4 grupos de diferentes tamaños: finas, $< 600 \mu\text{m}$; pequeñas, 600 a $850 \mu\text{m}$; medianas, $850 \mu\text{m}$ a 2 mm; y grandes, 2 mm a 5,6 mm; usando tamices de prueba estándar. Se determinó que la muestra original con partículas mixtas de SH tenía 38 % (en peso) de

partículas finas, 14 % de partículas pequeñas, 41 % de partículas medianas, y 7 % de partículas grandes.

En un lote de los experimentos de matraz de SSF, se evaluaron tres (3) sistemas con 3 grupos diferentes de tamaño de SH: pequeña, mediana y grande, respectivamente, y se midieron y compararon los rendimientos de esporas en los Días 5, 9 y 14. Estos resultados se muestran en la Figura 7.

En el otro lote de los experimentos de matraz de SSF, se evaluaron 4 sistemas con partículas de SH mixtas/originales, pequeñas, medianas y grandes, respectivamente, pero los rendimientos de esporas se midieron solo en el Día 14. Estos resultados se muestran en la Figura 8.

Los resultados de ambos lotes de experimentos indicaron que después de 14 días, los rendimientos de esporas de SSF de partículas de SH grandes y medianas fueron comparables y superiores a los rendimientos de partículas de SH pequeñas y mixtas. Los mejores rendimientos de esporas se atribuyeron al mayor espacio vacío creado por las partículas más grandes, lo que permitió una transferencia de oxígeno más rápida y homogénea desde el espacio de cabeza a todas las posiciones en el lecho de sustrato sólido para soportar el cultivo celular y la esporulación.

Ejemplo 8 - Sistema de SSF que utiliza una columna

La producción de esporas de SSF se amplió a partir de los matraces pequeños descritos anteriormente (que contenían 10 g de SH) a una columna del sistema de SSF que contenía de 50 a 75 g de SH. Las partículas de SH se mezclaron con la solución nutritiva que contenía nutrientes/compuestos solubles a la humedad y composición de nutrientes/química diseñada y se sometieron a autoclave. Después de enfriarse, la SH se inoculó con semillas de esporas, y se cargó en la columna. Para el suministro de oxígeno y la eliminación de calor metabólico, se introdujo un flujo de aire ascendente con una humedad particular desde el fondo de la columna. La velocidad de flujo del aire entrante se midió y controló mediante un medidor de flujo. La humedad del aire podría ajustarse mezclando una corriente de aire aproximadamente 100 % humidificada a través de una columna humidificadora con aire de baja humedad (es decir, aire ambiente) en diferentes proporciones de velocidades de flujo. Se realizó un experimento preliminar para medir el contenido de humedad de SH en la columna. Los resultados indicaron que el contenido de humedad de SH se estabilizó y permaneció relativamente constante (es decir, se equilibró con la humedad del flujo de aire) después de aproximadamente 48 horas de la introducción del flujo de aire humidificado.

Se realizaron dos conjuntos de experimentos con SH de diferentes tamaños de partícula (y de dos proveedores de SH diferentes). En una serie de experimentos, se cargaron aproximadamente 75 g de SH con las partículas originales de tamaños mixtos (93 % en peso con tamaños de partículas < 2 mm, que incluyen 38 % < 0,6 mm) de un proveedor hasta una altura de lecho de aproximadamente 34 cm en una columna de 5,1 cm de diámetro. El rendimiento de esporas medido después de 14 días fue $(7,5 \pm 1,6) \times 10^8$ esporas/g de SH. Este rendimiento fue menor que el rendimiento de $(11,0 \pm 0,5) \times 10^8$ esporas/g de SH obtenido en el matraz poco profundo en el Ejemplo 7 para las partículas de SH mixtas/originales (Figura 8), lo que indica un efecto negativo asociado con el uso de un lecho más profundo incluso cuando se introdujo flujo de aire convectivo a través de la columna.

En el otro conjunto de experimentos, el SH usado fue de otro proveedor y las partículas de SH tuvieron tamaños mucho mayores (83 % en peso en el rango de 2 a 5,6 mm). Las piezas más grandes tenían formas curvas y tamaños más grandes para crear vacíos más grandes en el volumen de SSF. Solo 48 g de SH (que era menor que los 75 g de SH anteriores) se podían cargar en la columna del mismo tamaño (5,1 cm de diámetro) a una altura inicial de lecho de aproximadamente 42 cm. El tamaño del lecho bajó a 37 cm después de 24 h. El rendimiento

de esporas medido después de 14 días fue $(7,0 \pm 1,2) \times 10^8$ esporas/g de SH. Este rendimiento no fue estadísticamente diferente del rendimiento de 14 días obtenido en un experimento de matraz poco profundo de este lote de SH, que fue $6,1 \pm 1,3 \times 10^8$ esporas/g de SH. A diferencia del uso anterior de las partículas de SH mixtas/pequeñas, no se observaron efectos negativos asociados con el uso de un lecho más profundo cuando estas piezas de SH grandes se usaron como sustrato sólido.

Cabe destacar que si bien el rendimiento de esporas de este lote de SH (mayor) (es decir, $(6,1 \pm 1,3) \times 10^8$ esporas/g de SH) fue menor que el rendimiento del otro lote de SH (menor) (es decir, $(11,0 \pm 0,5) \times 10^8$ esporas/g de SH) utilizado anteriormente, esto se atribuyó a las diferencias en las propias SH. Las cáscaras de diferentes variedades de soya pueden tener composiciones y estructuras bastante diferentes. Se encontró que *S. brevicaulis* se cultivaba más lentamente y esporulaba después cuando se cultivaba en este lote de SH más grande. Al cultivar en el otro lote de SH más pequeña, se encontró que la producción de esporas de *S. brevicaulis* se estabilizada después de aproximadamente 8 a 10 días. Pero al cultivar en este lote de SH más grande, la producción de esporas aumentó después de 14 días; de $(6,1 \pm 1,3) \times 10^8$

esporas/g de SH a los 14 días a $(9,4 \pm 1,0) \times 10^8$ esporas/g de SH a los 21 días.

Los grandes vacíos permitieron un buen flujo de aire convectivo a través del lecho para suministrar oxígeno de manera efectiva, eliminar el calor generado por el metabolismo celular y controlar y ajustar el contenido de humedad en el lecho.

Diversas modificaciones y alteraciones que no se apartan del alcance y espíritu de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica. Esta invención no debe limitarse debidamente a los ejemplos ilustrativos establecidos en la presente descripción.