

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991662 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2018.01.05

(51) Int. Cl. C12N 1/16 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A23K 10/12 (2016.01)
C11D 7/40 (2006.01)

(54) НОВЫЕ СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ФЕРМЕНТАЦИИ

(31) 62/443,356

(32) 2017.01.06

(33) US

(86) PCT/US2018/012561

(87) WO 2018/129299 2018.07.12

(71) Заявитель:
ЛОКУС АЙПИ КОМПАНИ, ЛЛК
(US)

(72) Изобретатель:
Алибек Кен, Фармер Шон, Адамс
Кент (US)

(74) Представитель:
Тагбергенова М.М., Тагбергенова А.Т.
(KZ)

(57) В заявленном изобретении предложены системы и устройства для получения композиций на основе микроорганизмов, которые можно использовать в нефтегазовой промышленности, для очистки окружающей среды, а также для других применений. Более конкретно, настоящее изобретение включает биологические реакторы, оборудование и материалы для ферментации композиций на основе микроорганизмов.

A1

201991662

201991662

A1

НОВЫЕ СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ФЕРМЕНТАЦИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США с номером 62/443356, поданной 6 января 2017 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам и системам для получения композиций на основе микроорганизмов, которые могут быть использованы, например, в нефтедобывающей промышленности, сельском хозяйстве, горнодобывающей промышленности, обработке отходов и биоремедиации.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Культивирование микроорганизмов, таких как бактерии, дрожжи и грибы, является важным для производства широкого спектра полезных биопрепаратов. Микроорганизмы играют решающую роль, например, в пищевой промышленности, фармацевтике, сельском хозяйстве, горнодобывающей промышленности, ремедиации и утилизации отходов.

Существует огромный потенциал для использования микроорганизмов в широком спектре отраслей промышленности. Ограничивающим фактором при коммерциализации продуктов на основе микроорганизмов была стоимость за плотность пропагул, где особенно дорого и невозможно применять продукты микроорганизмов для крупномасштабных производств с достаточным количеством инокулята, чтобы увидеть преимущества.

Существуют две основные формы культивирования микроорганизмов: глубинное культивирование и поверхностное культивирование. Бактерии, дрожжи и грибы могут быть выращены с использованием методов поверхностного или глубинного культивирования. Оба метода культивирования требуют питательную среду для роста микроорганизмов. Питательная среда, которая может находиться либо в жидкой, либо в твердой форме, обычно включает источник углерода, источник азота, соли и соответствующие дополнительные питательные вещества и микроэлементы.

Уровни pH и кислорода поддерживаются на значениях, подходящих для данного микроорганизма.

Микроорганизмы могут играть весьма полезную роль, например, в нефтяной и сельскохозяйственной промышленности, если только их можно будет сделать более доступными и, предпочтительно, в более активной форме.

Нефть и природный газ получают путем бурения поверхности земли с использованием того, что обычно называют буровой установкой. Нефтяная скважина или буровая скважина начинается с бурения отверстия большого диаметра (например, диаметром 24-36 дюймов) в поверхности земли с использованием бурового долота. Буровое долото прикреплено к бурильной трубе, которая вращается буровой установкой. Буровая установка, как правило, продолжает бурить большое отверстие, пока буровое долото не пройдет ниже уровня грунтовых вод. Затем металлический хвостовик (или обсадная колонна) помещается в отверстие большого диаметра, и через внутреннюю часть хвостовика прокачивается цемент. Когда цемент достигает дна хвостовика, он течет вверх, заполняя пустоту между хвостовиком и окружающим пластом, изолируя уровень грунтовых вод и защищая его от любых буровых растворов, которые закачиваются в скважину на последующих этапах.

После того, как первая обсадная колонна зацементирована, можно использовать долото среднего размера для более глубокого бурения в подземном пласте. Как правило, есть одна или несколько точек остановки, где буровое долото удаляется, за которыми следует меньший хвостовик обсадной колонны и цемент. Этот процесс повторяется до тех пор, пока скважина не будет завершена.

В процессе бурения буровые растворы прокачиваются через бурильную трубу и откачиваются из бурового долота. Затем указанный раствор течет обратно в пространство между бурильной трубой и пластом или обсадной колонной. Буровой раствор удаляет буровой шлам, уравнивает давление внутри скважины, смазывает буровую скважину, а также очищает буровую скважину от веществ, вызывающих трение.

После того, как скважина пробурена, обычно устанавливают эксплуатационный хвостовик (или обсадную колонну) и затем перфорируют скважину (например, используют взрывчатые вещества для пробития эксплуатационного хвостовика в определенных точках нефтеносного пласта). Затем нефть начинает вытекать из скважины либо под естественным давлением пласта, либо с помощью давления, которое создается механическим оборудованием, закачиванием воды или другими

способами. Когда сырая нефть течет через скважину, вещества в сырой нефти часто накапливаются на поверхностях эксплуатационных хвостовиков, вызывая снижение потока, а иногда даже останавливая добычу в целом.

Для предотвращения и устранения этой проблемы используются различные химические вещества и оборудование, но существует потребность в улучшенных продуктах и способах. В частности, существует потребность в продуктах и способах, которые являются более экологически чистыми, менее токсичными и имеют улучшенную эффективность.

В сельскохозяйственной отрасли фермеры в значительной степени полагаются на использование синтетических химических веществ и химических удобрений для повышения урожайности и защиты сельскохозяйственных культур от патогенов, вредителей и болезней; однако при чрезмерном или неправильном применении указанные вещества могут выступать в роли загрязнителей воздуха и воды посредством стоков, выщелачивания и испарения. Даже при правильном использовании чрезмерная зависимость и длительное использование определенных химических удобрений и пестицидов пагубно влияет на почвенные экосистемы, снижает устойчивость к стрессам, повышает устойчивость к вредителям и препятствует росту и жизнеспособности растений и животных.

Установление нормативных мандатов, регулирующих доступность и использование химических веществ, а также потребительский спрос на экологически чистые выращенные без шлаков продукты питания, произведенные с минимальным вредом для окружающей среды, влияют на отрасль и вызывают развитие мысли о том, как решать множество проблем. Спрос на более безопасные пестициды и альтернативные стратегии борьбы с вредителями возрастает. Хотя массовая ликвидация химических веществ в настоящее время невозможна, фермеры все чаще применяют биологические подходы в качестве эффективных компонентов программ комплексного управления питательными веществами и комплексного уничтожения вредных организмов.

Например, в последние годы биологическая борьба с нематодами вызвала большой интерес. Указанный способ в качестве пестицидов использует биологические агенты, такие как живые микроорганизмы, биопрепараты, полученные из этих микроорганизмов, и их комбинации. Указанные биологические пестициды имеют важные преимущества перед другими традиционными пестицидами. Например, они менее вредны по сравнению с традиционными химическими пестицидами. Они более

эффективны и специфичны. Они часто быстро разлагаются, что приводит к меньшему загрязнению окружающей среды.

Использование биопестицидов и других биологических агентов было в значительной степени ограничено трудностями в производстве, транспортировке, применении, ценообразовании и эффективности. Например, многие микроорганизмы трудно выращивать и впоследствии использовать в сельскохозяйственных и лесохозяйственных системах в достаточных количествах, чтобы они были полезными. Указанная проблема усугубляется потерями жизнеспособности и/или активности из-за обработки, заключения в композиции, хранения и стабилизации перед распространением. Кроме того, после применения биологические продукты могут не давать эффекта по ряду причин, в том числе, например, из-за недостаточной начальной плотности клеток, невозможности эффективно конкурировать с существующей микрофлорой в конкретном месте, и из-за введения в почву и/или другие условия окружающей среды, в которых микроорганизм не может размножаться или даже выжить.

Композиции на основе микроорганизмов могут помочь решить некоторые из вышеупомянутых проблем, с которыми сталкивается сельскохозяйственная промышленность, нефтегазовая промышленность, а также многие другие. Таким образом, существует потребность в более эффективных способах культивирования для массового производства микроорганизмов и метаболитов микроорганизмов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены материалы, способы и системы для получения композиций на основе микроорганизмов, которые могут быть использованы в нефтегазовой промышленности, сельском хозяйстве, здравоохранении и очистке окружающей среды, а также для множества других применений. В частности, в заявленном изобретении предложены материалы, способы и системы для эффективного культивирования микроорганизмов и получения побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Варианты осуществления настоящего изобретения предлагают новые, недорогие способы и системы ферментации. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены биологические реакторы для ферментации. В конкретных вариантах осуществления системы используются для получения композиций на основе дрожжей и/или композиций на основе других микроорганизмов. В определенных

конкретных вариантах осуществления системы могут использоваться для получения композиций дрожжей *Starmerella bombicola*.

Системы могут быть использованы для выращивания дрожжей, грибов и бактерий. В определенных вариантах осуществления системы могут быть использованы для получения композиций на основе дрожжей, включая, например, композиции, содержащие дрожжи *Starmerella bombicola*, *Wickerhamomyces anomalus* и/или *Pseudozyma aphidis*. В некоторых вариантах осуществления системы могут использоваться для получения композиций на основе бактерий, включая, например, композиции, содержащие *Bacillus subtilis* и/или *Bacillus licheniformis*.

В конкретном варианте осуществления система по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, два резервуара, которые соединены друг с другом трубкой. В этом реакторе со множеством резервуаров, насос проталкивает культуру микроорганизмов через трубку из одного резервуара в другой резервуар. В предпочтительных вариантах трубка установлена на или вблизи верхней части резервуаров. Когда культура движется по трубке, она может быть насыщена кислородом воздухом, выталкиваемым в поток жидкости, например, воздушным компрессором. Указанное перемешивает и насыщает кислородом культуру. Ближе к нижней части резервуаров еще одна трубка соединяет два резервуара, чтобы сбалансировать уровни культуры в каждом резервуаре. Указанная трубка может иметь другой вход, чтобы облегчить добавление воздуха. Следовательно, указанная трубка может обеспечить дополнительное перемешивание и аэрацию. Кроме того, оба резервуара могут быть дополнены отдельными системами барботирования.

Инокуляция может происходить в одном или обоих резервуарах, и инокулят перемешивают в обоих резервуарах через вышеупомянутые системы трубок. В предпочтительных вариантах осуществления системы со множеством резервуаров, насос или насосы работают непрерывно на протяжении всего процесса ферментации. Скорость потока может составлять, например, от 10 до 20-200 галлонов в минуту. В конкретных вариантах осуществления полный обмен культурой происходит между резервуарами каждые 5-10 минут.

Преимущественно, системы по настоящему изобретению можно масштабировать в зависимости от предполагаемого использования. Например, размеры резервуаров могут варьироваться от нескольких галлонов до десятков тысяч галлонов.

В одном варианте осуществления в заявленном изобретении предложены способы культивирования микроорганизмов без загрязнения с использованием

заявленной системы. В определенных вариантах осуществления способы культивирования включают добавление культуральной среды, содержащей воду и питательные компоненты, к заявленным системам с использованием, например, перистальтического насоса; инокуляцию системы жизнеспособным микроорганизмом; и, необязательно, добавление противомикробного агента в культуральную среду. Противомикробный агент может представлять собой, например, антибиотик или софоролипид.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении дополнительно предложена композиция, содержащая, по меньшей мере, один тип микроорганизма и/или, по меньшей мере, один метаболит микроорганизма, продуцируемый микроорганизмом, который был выращен с использованием системы ферментации по настоящему изобретению. Микроорганизмы в композиции могут находиться в активной или неактивной форме. Композиция также может быть в сухой форме или в жидкой форме.

Преимущественно, способ и оборудование по настоящему изобретению снижают капитальные и трудовые затраты на получение микроорганизмов и их метаболитов в крупных масштабах. Кроме того, процесс культивирования по настоящему изобретению уменьшает или устраняет необходимость концентрировать организмы после завершения культивирования. В настоящем изобретении предложен способ культивирования, который не только существенно повышает выход продуктов микроорганизмов на единицу питательной среды, но и упрощает производство и облегчает транспортабельность.

Транспортабельность может привести к значительной экономии средств, поскольку композиции на основе микроорганизмов могут быть получены на месте предполагаемого использования или вблизи него. Это означает, что конечная композиция может быть изготовлена на месте с использованием материалов из местных источников, если это необходимо, тем самым снижая затраты на доставку. Кроме того, композиции могут включать жизнеспособные микроорганизмы во время применения, что может повысить эффективность продукта.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления системы по настоящему изобретению используют возможности природных микроорганизмов и их побочных продуктов их метаболизма. Использование локальных популяций микроорганизмов может быть выгодным в случаях, включающих экологическую ремедиацию (как в случае разлива нефти), животноводство, культивирование водных

организмов, лесоводство, уход за пастбищами, уход за газоном, декоративное садоводство, удаление и переработку отходов, добычу полезных ископаемых, добычу нефти и здравоохранение человека, в том числе в удаленных местах, но не ограничиваясь ими.

Композиции, полученные в соответствии с настоящим изобретением, также могут быть использованы в самых разнообразных применениях в нефтяной промышленности, таких как микробиологическое повышение добычи нефти. Указанные применения включают повышение добычи сырой нефти; стимуляцию нефтяных и газовых скважин (для улучшения притока нефти в ствол скважины); удаление загрязнений и/или засоров таких как парафины, асфальтены и отложения с оборудования такого как стержни, трубы, хвостовики, резервуары и насосы; предотвращение коррозии нефтегазодобывающего и транспортного оборудования; снижение концентрация H_2S в сырой нефти и природном газе; снижение вязкости сырой нефти; переработку тяжелой сырой нефти и асфальтенов на более легкие углеводородные фракции; очистку резервуаров, нефтепроводов и трубопроводов; повышение подвижности нефти во время обводнения скважины не смотря на селективное и неселективное закупоривание; и жидкости для гидроразрыва, но не ограничиваются ими.

При использовании в нефтегазовой отрасли, системы по настоящему изобретению могут быть использованы для снижения стоимости нефтепромысловых композиций на основе микроорганизмов и могут использоваться в сочетании с другими химическими усилителями, такими как полимеры, растворители, фракционный песок и гранулы, эмульгаторы, поверхностно-активные вещества, и другие материалы, известные в данной области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **Фигуре 1** показана система с двумя резервуарами согласно одному варианту осуществления изобретения.

На **Фигуре 2** показан вид сбоку системы с двумя резервуарами согласно одному варианту осуществления изобретения, включая иллюстративные замеры резервуара.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены материалы, способы и системы для получения композиций на основе микроорганизмов, которые могут быть использованы

в нефтегазовой промышленности, культивирование водных организмов, сельском хозяйстве, очистке окружающей среды, здравоохранении, а также в других областях применения. Более конкретно, в предпочтительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биологические реакторы для ферментации композиций на основе дрожжей и/или других микроорганизмов.

Варианты осуществления настоящего изобретения также предлагают новые, недорогие способы и системы ферментации. Системы могут быть использованы для культивирования дрожжей, грибов и бактерий и/или получения побочных продуктов их жизнедеятельности. В определенных вариантах осуществления системы могут быть использованы для получения композиций на основе дрожжей, включая, например, композиции, содержащие дрожжи *Starmerella bombicola*, *Wickerhamomyces anomalus* и/или *Pseudozyma aphidis*. В некоторых вариантах осуществления системы могут использоваться для получения композиций на основе бактерий, включая, например, композиции, содержащие *Bacillus subtilis* и/или *Bacillus licheniformis*.

В предпочтительном варианте осуществления, где культивируют дрожжи, полученная композиция может иметь одно или несколько из следующих преимущественных свойств: высокие концентрации маннопротеина и бета-глюкана как части клеточной стенки дрожжей; и наличие био-ПАВ и других метаболитов микроорганизмов (например, молочной кислоты и этанола, и т. д.) в культуре.

Выбранные определения

Используемый в данном документе термин «композиция на основе микроорганизмов» означает композицию, которая содержит компоненты, которые были получены в результате жизнедеятельности микроорганизмов или других клеточных культур. Таким образом, композиция на основе микроорганизмов может содержать сами микроорганизмы и/или побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Микроорганизмы могут находиться в вегетативном состоянии, в форме спор, в форме мицелия, в любой другой форме пропагул или их смеси. Микроорганизмы могут быть в форме планктона или в форме биопленки, или в виде смеси обоих. Побочными продуктами жизнедеятельности могут быть, например, метаболиты, компоненты клеточной мембраны, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть целыми или лизированными. В предпочтительных вариантах осуществления микробы присутствуют вместе с бульоном, в котором они были выращены, в композиции на основе микроорганизмов.

Клетки могут присутствовать, например, в концентрации 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , или 1×10^{11} или более пропагул на миллилитр композиции. Используемый в данном документе термин пропaгула означает любую часть микроорганизма, из которой может развиваться новый и/или зрелый организм, включая клетки, споры, мицелий, почки и семена, но не ограничиваясь ими.

В заявленном изобретении дополнительно предложены «продукты на основе микроорганизмов», которые представляют собой продукты, которые должны применяться на практике для достижения желаемого результата. Продукт на основе микроорганизмов может представлять собой просто композицию на основе микроорганизмов, собранную в процессе культивирования микроорганизмов. Альтернативно, продукт на основе микроорганизмов может содержать дополнительные ингредиенты, которые были добавлены. Указанные дополнительные ингредиенты могут включать, например, стабилизаторы, буферы, подходящие носители, такие как вода, растворы солей или любой другой подходящий носитель, добавленные питательные вещества для поддержки дальнейшей жизнедеятельности микроорганизмов, усилители роста, не являющиеся питательными веществами, такие как гормоны растений, и/или агенты, которые облегчают отслеживание микроорганизмов и/или композиции в среде, в которой они применяются. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать смеси композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать один или несколько компонентов композиции на основе микроорганизмов, которые были обработаны каким-либо образом, таким как фильтрация, центрифугирование, лизирование, сушка, очистка и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин «собранный» относится к удалению части или всей композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания.

Используемый в данном документе термин «биопленка» представляет собой сложный агрегат микроорганизмов, таких как бактерии, в котором клетки склеены друг с другом. Клетки в биопленках физиологически отличаются от планктонных клеток одного и того же организма, которые представляют собой отдельные клетки, которые могут плавать на поверхности или плавать в толще в жидкой культуральной среде.

Используемый в данном документе термин «борьба» используется в отношении активности, характерной заявленным микроорганизмам, которая распространяется на уничтожение, потерю активности или иммобилизацию вредителей, или иным образом приводит к практической неспособности вредителей причинять вред.

Используемый в данном документе термин «изолированная» или «очищенная» молекула нуклеиновой кислоты, полинуклеотид, полипептид, белок или органическое соединение, такое как малая молекула (например, те, которые описаны ниже), по существу не содержит других соединений, таких как клеточный материал, с которым она связана в природном состоянии. Используемый в данном документе термин «изолированный» по отношению к штамму микроорганизма означает, что штамм изолирован из среды, в которой он существует в природном состоянии. Таким образом, выделенный штамм может существовать в виде, например, биологически чистой культуры или в виде спор (или других форм штамма) в сочетании с носителем.

В определенных вариантах осуществления очищенные соединения составляют по меньшей мере 60 мас. % (сухой вес) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат составляет, по меньшей мере, 75 мас. %, более предпочтительно, по меньшей мере, 90 мас. % и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99 мас. % представляющего интерес соединения. Например, очищенное соединение представляет собой соединение, которое составляет по меньшей мере 90 мас. %, 91 мас. %, 92 мас. %, 93 мас. %, 94 мас. %, 95 мас. %, 98 мас. %, 99 мас. % или 100 мас. % желаемого соединения по массе. Чистота измеряется любым подходящим стандартным методом, например, колоночной хроматографией, тонкослойной хроматографией или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) не содержит генов или последовательностей, которые фланкируют его в своем естественном состоянии. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые его фланкируют в своем естественном состоянии.

Термин «метаболит» относится к любому веществу, продуцируемому в метаболизме, или веществу, необходимому для участия в определенном метаболическом процессе. Метаболит может представлять собой органическое соединение, которое является исходным веществом (например, глюкоза), промежуточным соединением (например, ацетил-КоА) или конечным продуктом (например, н-бутанол) метаболизма. Примеры метаболитов включают ферменты, токсины, кислоты, растворители, спирты, белки, витамины, минеральные вещества, микроэлементы, аминокислоты и био-ПАВ, но не ограничиваются ими.

Используемый в данном документе термин «ПАВ» относится к соединению, которое снижает поверхностное натяжение (или межфазное натяжение) между двумя

жидкостями или между жидкостью и твердым веществом. ПАВ действуют как детергенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, пенообразователи и диспергаторы. Термин «био-ПАВ» представляет собой ПАВ, продуцируемое живым организмом.

Проектирование и эксплуатация системы ферментации

В конкретном варианте осуществления система по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, два резервуара, которые соединены друг с другом трубкой. Насос проталкивает культуру микроорганизмов через трубку из одного резервуара в другой резервуар. В предпочтительных вариантах трубка установлена на или вблизи верхней части резервуаров. Насос может иметь вход, соединенный с первым резервуаром через первую трубку (или шланг, или трубу), и выход, соединенный со вторым резервуаром через вторую трубку.

Один или несколько воздушных компрессоров могут быть включены для аэрации, и каждый воздушный компрессор может, необязательно, иметь воздушный фильтр для предотвращения загрязнения. Воздушные компрессоры могут быть соединены к одному или нескольким газовым инжекторам, барботерам и/или аэраторам. Газовые инжекторы могут быть расположены, например, в любой и/или во всех трубках и/или резервуарах реактора. Барботеры и/или аэраторы могут быть расположены в любом и/или во всех резервуарах. Когда культура движется по трубке, она может быть насыщена кислородом воздухом, выталкиваемым в поток жидкости, например, воздушным компрессором. Указанное перемешивает и насыщает кислородом культуру.

Ближе к нижней части резервуаров может быть подсоединена третья трубка (или шланг, или труба) от второго резервуара к первому резервуару. Третья трубка позволяет жидкости перемещаться под гидростатическим давлением из второго резервуара в первый резервуар. Указанная трубка соединяет два резервуара, чтобы сбалансировать уровни культуры в каждом резервуаре. Указанная трубка может иметь другой вход, чтобы облегчить добавление воздуха. Следовательно, указанная трубка может обеспечить дополнительное перемешивание и аэрацию. Система может включать клапан регулирования потока на выходе первого насоса, подходящий для управления скоростью потока первого насоса. Первый насос также может управляться с помощью двигателя с переменной частотой, так что скорость потока может быть должным образом отрегулирована путем изменения электрической частоты.

Трубка в верхней части двух резервуаров предпочтительно соединена с каждым резервуаром в точке, которая находится в верхних 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15%, 10 %, 5 %, 2 % и 1 % бака. Трубка ближе к нижней части двух резервуаров предпочтительно соединена с каждым резервуаром в точке, которая находится в нижних 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15%, 10 %, 5 %, 2 % и 1 % бака.

Насос и/или насосы системы могут иметь такие размеры, чтобы подходить для установления коэффициента рециркуляции (объем перекачиваемой жидкости в час/общий объем жидкости реактора) в диапазоне, например, от 30 до 0,10. Насос может быть центробежным насосом. Система может включать один или несколько запорных клапанов (любой общий клапан, используемый для остановки потока) на первом баке и на входе и выходе второго бака. Шланг может быть подсоединен к первому насосу (или второму насосу, соединенному с реактором) для слива содержимого реактора и перекачки композиции в место ее предполагаемого использования. Насадка может быть расположена на конце шланга и подходить для распыления композиции.

В предпочтительных вариантах осуществления системы насос или насосы работают непрерывно на протяжении всего процесса ферментации. Скорость потока может составлять, например, от 10 до 20-200 галлонов в минуту. В конкретных вариантах осуществления полный обмен культурой происходит между резервуарами каждые 5-10 минут.

Система может включать одно или несколько смотровых стекол, например, на любой и/или на всех трубках и/или резервуарах для визуального мониторинга процесса ферментации. Кроме того, любая и/или все трубки могут иметь обратный клапан для предотвращения обратного перемещения.

Один или несколько вентиляционных отверстий (или клапаны сброса давления (PSV)) могут быть расположены на любом и/или на всех резервуарах. Вентиляционные отверстия или PSV могут пропускать газы, но не позволяют входить воздуху (например, клапан может открываться, когда внутреннее давление газа в реакторе превышает 1,2 атм, и может закрываться, когда внутреннее давление газа падает ниже 1,1 атм).

Резервуары, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой любой ферментер или реактор для культивирования для промышленного использования. Указанные резервуары могут быть изготовлены, например, из стекла, полимеров, металлов, металлических сплавов и их комбинаций.

Резервуары могут быть, например, от 5 литров до 2000 литров или более. Как правило, объем резервуаров составляет от 10 до 1500 литров, и предпочтительно от 100 до 1000 литров, и более предпочтительно от 250 до 750 литров, от 300 до 600 литров или от 400 до 550 литров.

Перед выращиванием микроорганизмов резервуары можно дезинфицировать или стерилизовать. В одном варианте осуществления среда для ферментации, воздух и оборудование, используемые в способе и процессе культивирования, являются стерильными. Оборудование для культивирования, такое как реактор/емкость, может быть отдельным от стерилизационного устройства, например, от автоклава, но соединено с ним. Оборудование для культивирования также может иметь стерилизационный блок, который стерилизует *in situ* перед началом инокуляции, например, с использованием парогенератора. Воздух можно стерилизовать способами, известными в данной области техники. Например, окружающий воздух может проходить через, по меньшей мере, один фильтр, перед добавлением в емкость. В других вариантах осуществления культуральная среда может быть пастеризована или, необязательно, вообще не нагреваться, причем может быть использовано низкая активность воды и низкий pH для борьбы с ростом бактерий.

Система может быть использована в качестве реактора периодического действия (в отличие от реактора непрерывного действия). Преимущественно система может масштабироваться в зависимости от ее предполагаемого использования. Для применения в небольших объемах, таких как, например, биоремедиация, система может составлять всего 50 галлонов или даже меньше. Для применений, где необходимы большие объемы композиции, такие как микробиологическое повышение добычи нефти, система может быть масштабирована для производства 20000 или более галлонов продукта.

Система может включать регуляторы температуры. Система может быть изолирована таким образом, чтобы в процессе ферментации поддерживалась соответствующая температура в условиях низкой температуры окружающей среды. Может применяться любой из изоляционных материалов, известных в данной области, включая стекловолокно, силикагель, изоляцию из керамического волокна и т. д. Изоляция может окружать любые и/или все трубки и/или резервуары системы.

Система также может быть адаптирована для обеспечения поддержания соответствующей температуры ферментации. Например, внешняя часть системы может быть отражающей, чтобы избежать повышения температуры системы в течение

дня. Кроме того, может быть добавлена система охлаждения, которая включает, например, одну или несколько охлаждающий кожух и охлаждающий теплообменник. Охлаждающая вода может обмениваться теплом с окружающим воздухом и рециркулировать в системе охлаждения. Теплообменник и/или охлаждающий кожух могут окружать или устанавливаться в любые и/или во все трубы и/или резервуары системы. Для экстремальных условий система может включать холодильные и охлаждающие змеевики внутри реактора, кожух, окружающий реактор, или теплообменники, соединенные с трубами.

Система может использовать электрический нагреватель. Однако для применений с большими объемами, где требуется тепло, можно использовать пар или углеводородное топливо. Вход пара и/или источник пара могут быть соединены с одним или несколькими из парового инжектора, парового кожуха и парового теплообменника. Паровой кожух может окружать любые и/или все трубы и/или резервуары системы. Кроме того, пар может вводиться непосредственно в любую и/или все трубы и/или резервуары системы. Паровой теплообменник может быть размещен внутри реактора, пар может конденсироваться внутри трубок теплообменника, а затем выводиться. Паровой теплообменник может представлять собой замкнутую систему, которая не смешивает воду или пар с содержимым реактора.

В одном варианте осуществления резервуар может иметь функциональные элементы управления/датчики или может быть соединен с функциональными элементами управления/датчиками для измерения важных факторов в процессе культивирования, таких как pH, кислород, давление, температура, мощность на валу мешалки, влажность, вязкость и/или плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболитов.

Термометр может быть включен, и термометр может быть ручным или автоматическим. Термометр предпочтительно может быть размещен на любом и/или на всех резервуарах реактора. Автоматический термометр может управлять источниками тепла и охлаждения соответствующим образом, чтобы контролировать температуру в течение всего процесса ферментации. Требуемые температуры могут быть запрограммированы на месте или предварительно запрограммированы до того, как система будет доставлена на участок ферментации. Измерения температуры могут затем использоваться для автоматического управления системами нагрева и охлаждения, которые обсуждались выше.

Регулировка pH может быть выполнена автоматически или вручную. Автоматическая регулировка pH может включать датчик pH и электронное устройство для надлежащего распределения корректирующих pH веществ в зависимости от измерений pH. Датчик pH предпочтительно может быть размещен на любом и/или на всех резервуарах реактора. Значение pH может быть установлено пользователем на определенное значение или может быть предварительно запрограммировано для соответствующего изменения pH в течение всего процесса ферментации. Если регулирование pH должно выполняться вручную, в систему для ручного тестирования могут быть включены известные в данной области техники инструменты для измерения pH.

Компьютерная система для измерения и регулировки pH и температуры может использоваться для мониторинга и контроля параметров ферментации для каждого резервуара реакторов. Компьютер может быть соединен, например, с термометром и датчиком pH. В дополнение к мониторингу и контролю температуры и pH, каждая емкость может также иметь возможность для мониторинга и контроля, например, растворенного кислорода, перемешивания, пенообразования, чистоты культур микроорганизмов, продукции желаемых метаболитов и тому подобного. Системы могут быть дополнительно адаптированы для дистанционного мониторинга этих параметров, например, с помощью планшета, смартфона или другого мобильного вычислительного устройства, способного отправлять и принимать данные по беспроводной сети.

В дополнительном варианте осуществления резервуары также могут быть способны отслеживать рост микроорганизмов внутри емкости (например, измерение количества клеток и фаз роста). Альтернативно, суточный образец может быть взят из емкости и подвергнут подсчету методами, известными в данной области техники, такими как посев методом разведения. Посев методом разведения - это простой метод, используемый для подсчета количества бактерий в образце. Указанным методом также можно рассчитать индекс, по которому можно сравнивать различные среды или методы обработки.

В одном варианте осуществления система ферментации представляет собой мобильный или переносной биореактор, который может быть предусмотрен для производства микробиологического продукта, включающего подходящее количество желаемого штамма микроорганизма, на месте. Поскольку микробиологический продукт образуется на месте применения, не прибегая к процессам стабилизации,

консервации, хранения и транспортировки бактерий традиционного производства, может быть получена гораздо более высокая плотность живых микроорганизмов, что требует гораздо меньшего объема композиции микроорганизмов для использования в применении на месте. Это позволяет использовать уменьшенный биореактор (например, меньшие резервуары для ферментации, меньшие запасы исходного материала, питательных веществ, агентов для регулирования pH и пеногасителей и т. д.), что способствует мобильности и портативности системы.

Система может включать каркас для поддержки компонентов аппарата (включая резервуары, контуры потока, насосы и т. д.). Система может включать колеса для перемещения аппарата, а также ручки для управления, толкания и тяги при маневрировании аппарата.

Система может быть сконфигурирована в кузове одного или нескольких грузовых прицепов и/или полуприцепов. То есть система может быть сконструирована так, чтобы быть портативной (то есть система может быть пригодна для транспортировки на пикапе, бортовом прицепе или полуприцепе).

Микроорганизмы

Микроорганизмами, выращенными в соответствии с системами и способами по настоящему изобретению, могут быть, например, бактерии, дрожжи и/или грибы. Эти микроорганизмы могут быть природными или генетически модифицированными микроорганизмами. Например, микроорганизмы могут быть трансформированы специфическими генами для проявления специфических характеристик. Микроорганизмы также могут быть мутантами желаемого штамма. Процедуры получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, ультрафиолетовый свет и нитрозогуанидин широко используются для этой цели.

Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы для производства широкого спектра полезных продуктов, включая, например, биопестициды, био-ПАВ, этанол, питательные соединения, терапевтические белки, такие как инсулин, соединения, используемые в качестве вакцин, и другие биополимеры. Микроорганизмы, используемые в качестве указанных микробиологических производств, могут быть природными, мутантными или рекомбинантными.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи или грибы. Виды дрожжей и грибов, пригодные для использования согласно

настоящему изобретению, включают *Candida*, *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii* *sequela*, *S. torula*), *Issalchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Starmerella* (например, *S. bombicola*), *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma aphidis*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (например, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*), *Rhizopus* spp., *Mycorrhiza* (например, *Glomus* spp., *Acaulospora* spp., везикулярно-арбускулярную микоризу (VAM), арбускулярную микоризу (AM)), эндофитные грибы (например, *Piriformis indica*), любой штамм дрожжей-киллеров и их комбинации.

В одном варианте осуществления дрожжи являются дрожжами-киллерами. Используемый в данном документе термин «дрожжи-киллеры» означает штамм дрожжей, характеризующийся секрецией токсических белков или гликопротеинов, против которого сам штамм является невосприимчивым. Экзотоксины, выделяемые дрожжами-киллерами, способны убивать другие штаммы дрожжей, грибов или бактерий. Например, микроорганизмы, с которыми можно бороться дрожжами-киллерами, включают *Fusarium* и другие нитчатые грибы. Примерами дрожжей-киллеров в соответствии с настоящим изобретением являются те, которые можно безопасно использовать в пищевой промышленности и ферментации, например, в пивоварении, виноделии и в хлебопечении; те, которые могут быть использованы для борьбы с другими микроорганизмами, которые могут загрязнять такие производственные процессы; те, которые могут быть использованы в биоборьбе для сохранения пищевых продуктов; те, которые могут быть использованы для лечения грибных инфекций у людей и растений; и те, которые могут быть использованы в технологии рекомбинантных ДНК. Такие дрожжи могут включать *Wickerhamomyces*, *Pichia* (например, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*), *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, (например, *H. uvarum*), *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (например, *Z. bailii*), и другие, но не ограничиваются ими.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи-киллеры, такие как дрожжи *Pichia*, выбранные из *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia guilliermondii* и *Pichia kudriavzevii*. *Pichia anomala*, в частности, является эффективным продуцентом различных растворителей, ферментов, токсинов-киллеров, а также софоролипидных био-ПАВ.

В одном варианте осуществления штамм микроорганизма выбран из клады *Starmerella*. Культура микроорганизма *Starmerella* полезна в соответствии с заявленным изобретением, *Starmerella bombicola*, может быть получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 Университетский бул., Манассас, Ва. 20110-2209 США. Депозиту присвоен депозитарием депозитарный номер ATCC 22214.

В системе также можно использовать один или несколько штаммов дрожжей, способных к повышению добычи нефти и деградации парафина, например, *Starmerella (Candida) bombicola*, *Candida apicola*, *Candida batistae*, *Candida floricola*, *Candida riocensis*, *Candida stellate*, *Candida kuoi*, *Candida sp. NRRL Y-27208*, *Rhodotorula bogoriensis sp.*, *Wickerhamiella domericqiae*, а также любые другие продуцирующие софоролипид штаммы клады *Starmerella*. В конкретном варианте осуществления штамм дрожжей представляет собой штамм ATCC 22214 и его мутанты.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой штамм *Pseudozyma aphidis*. Указанный микроорганизм является эффективным продуцентом био-ПАВ липида маннозилеритрита (MEL).

В одном варианте осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Указанные бактерии могут быть, например, *Bacillus* (например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquifaciens*), *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *Clostridium NIPER 7* и *C. beijerinckii*), *Azobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Pseudomonas* (*P. chlororaphis subsp. aureofaciens (Khuyver)*, *P. aeruginosa*), *Azospirillum brasiliensis*, *Ralslonia eulopha*, *Rhodospirillum rubrum*, *Sphingomonas* (например, *S. paucimobilis*), *Streptomyces* (например, *S. griseochromogenes*, *S. griseus*, *S. cacaoi*, *S. aureus* и *S. kasugaensis*), *Streptoverticillium* (например, *S. rimofaciens*), *Ralslonia* (например, *R. eulopha*), *Rhodospirillum* (например, *R. rubrum*), *Xanthomonas* (например, *X. campestris*), *Erwinia* (например, *E. carotovora*), *Escherichia coli*, *Rhizobium* (например, *R. japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *R. leguminosarum biovar trifolii* и *R. etli*), *Bradyrhizobium* (например, *B. japonicum* и *B. parasponia*), *Arthrobacter* (например, *A. radiobacter*), *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter* (например, *C. xyli subsp. xyli* и *C. xyli subsp. cynodontis*), *Cyanobacteria*, *Pantoea* (например, *P. agglomerans*) и их комбинации, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой штамм *B. subtilis*, такой как, например, *B. subtilis* var. *locuses* B1 или B2, которые являются эффективными продуцентами, например, сурфактина и других био-ПАВ, а также биополимеров. В данное описание включена международная публикация WO 2017/044953 A1 в качестве ссылки в той степени, в которой она соответствует раскрытию данной заявки. В другом варианте осуществления микроорганизм представляет собой штамм *Bacillus licheniformis*, который является эффективным продуцентом био-ПАВ, а также биополимеров, таких как леван.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой непатогенный штамм *Pseudomonas*. Предпочтительно, штамм является продуцентом рамнолипидных био-ПАВ.

Другие штаммы микроорганизмов, включая, например, штаммы, способные накапливать значительные количества, например, гликолипид-био-ПАВ, могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением. Другие побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают маннопротеин, бета-глюкан и другие метаболиты, которые обладают биоэмульгирующими свойствами и способствуют снижению поверхностного/межфазного натяжения.

В одном варианте осуществления в емкости выращивают микроорганизмы одного типа. В альтернативных вариантах осуществления множество микроорганизмов, которые могут быть выращены вместе без вредного воздействия на рост или полученный продукт, могут быть выращены в одной емкости. Например, в одной емкости можно выращивать от 2 до 3 или более разных микроорганизмов.

Способы культивирования с использованием заявленных систем ферментации

В заявленном изобретении предложены способы и системы для эффективного производства микроорганизмов с использованием новых биологических реакторов. Система может включать все материалы, необходимые для процесса ферментации (или культивирования), включая, например, оборудование, материалы для стерилизации и компоненты культуральной среды, хотя ожидается, что пресная вода может поставляться из местного источника и стерилизоваться в соответствии с заявленными способами.

В одном варианте осуществления система снабжена инокулятом жизнеспособных микроорганизмов. Предпочтительно, микроорганизмы представляют

собой микроорганизмы-продуценты биохимических веществ, способными накапливать, например, био-ПАВ, ферменты, растворители, биополимеры, кислоты и/или другие полезные метаболиты. В особенно предпочтительных вариантах осуществления микроорганизмы представляют собой и включают дрожжи-продуценты биохимических веществ (включая дрожжи-киллеры), грибы и/или бактерии, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления система снабжена культуральной средой. Среда может включать источники питательных веществ, например, источник углерода, источник липидов, источник азота и/или источник микроэлементов. Каждый из источника углерода, источника липидов, источника азота и/или источника микроэлементов могут предоставляться в отдельной упаковке, которую можно добавлять в реактор в подходящее время в течение процесса ферментации. Каждая из упаковок может включать несколько упаковок, которые могут быть добавлены в определенных точках (например, когда уровни дрожжей, pH и/или питательных веществ снижаются или превышают определенную концентрацию) или в определенное время (например, через 10 часов, 20 часов, 30 часов, 40 часов и т. д.) во время процесса ферментации.

Перед ферментацией резервуары можно промыть раствором перекиси водорода (например, от 2,0 % до 4,0 % перекиси водорода; это можно сделать до или после промывки горячей водой, например, при 80-90 °C), чтобы предотвратить загрязнение. Кроме того, или в качестве альтернативы, резервуары могут быть промыты коммерческим обеззараживающим средством, дезинфицирующим раствором и/или сполоснуты горячей водой или паром. Система может поставляться с концентрированными формами дезинфицирующего раствора и перекиси водорода, которые впоследствии могут быть разбавлены на месте ферментации перед использованием. Например, перекись водорода может быть предоставлена в концентрированной форме и разбавлена для приготовления 2,0-4,0 % перекиси водорода (по массе или объему) для предварительного промывания-дезинфекции.

В конкретном варианте осуществления способ культивирования включает стерилизацию заявленных реакторов для ферментации перед ферментацией. Внутренние поверхности реактора (включая, например, резервуары, входные отверстия, аэраторы и системы перемешивания) можно сначала промыть коммерческим дезинфицирующим средством; затем покрыть туманом (или распылить высокодисперсной системой распыления) 2 % до 4 % перекисью водорода,

предпочтительно 3 % перекисью водорода; и, наконец, обработать паром при помощи портативного парогенератора при температуре от примерно 105 °C до примерно 110 °C или выше.

Компоненты культуральной среды (например, источник углерода, вода, источник липидов, микроэлементы и т.д.) также могут быть стерилизованы. Это может быть достигнуто с помощью температурного обеззараживания и/или обеззараживания перекисью водорода (возможно с последующей нейтрализацией перекиси водорода с использованием кислоты, такой как HCl, H₂SO₄ и т.п.).

В конкретном варианте осуществления вода, используемая в культуральной среде, стерилизуется УФ-излучением с использованием встроенного УФ-стерилизатора воды и фильтруется с использованием, например, 0,1-микронного фильтра для воды. В другом варианте осуществления все питательные и другие компоненты среды могут быть автоклавированы перед ферментацией.

Для дальнейшего предотвращения загрязнения культуральная среда системы может содержать дополнительные кислоты, антибиотики и/или противомикробные средства, добавленные до и/или во время процесса культивирования. Одно или несколько противомикробных веществ могут включать, например, стрептомицин, окситетрациклин, софоролипиды и рамнолипиды.

Инокуляция может происходить в любом и/или во всех резервуарах реактора, и в этот момент инокулят перемешивается с использованием системы трубок. Общее время ферментации может составлять от 10 до 200 часов, предпочтительно от 20 до 180 часов.

Температура ферментации, используемая в заявленных системах и способах, может составлять, например, от примерно 25 до 40 °C, хотя процесс может происходить за пределами этого диапазона. В одном варианте осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от примерно 5 до примерно 100 °C, предпочтительно от 15 до 60 °C, более предпочтительно от 25 до 50 °C. В дополнительном варианте осуществления культивирование может проводиться непрерывно при постоянной температуре. В другом варианте культивирование может подвергаться изменению температуры.

Значение pH культуральной среды должно соответствовать интересующему микроорганизму. Буферные соли и регуляторы pH, такие как карбонаты и фосфаты, могут быть использованы для стабилизации pH около оптимального значения. Когда

ионы металлов присутствуют в высоких концентрациях, может потребоваться использование хелатирующего агента в жидкой питательной среде.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы могут быть ферментированы в диапазоне pH от примерно 2,0 до примерно 10,0 и, более конкретно, в диапазоне pH от примерно 3,0 до примерно 7,0 (путем ручной или автоматической регулировки pH с использованием оснований, кислот и буферов; например, HCl, KOH, NaOH, H₂SO₄ и/или H₃PO₄). Изобретение также может быть осуществлено за пределами этого диапазона pH.

Ферментация может начинаться при первом значении pH (например, pH от 4,0 до 4,5), которое затем изменяться до второго значения pH (например, pH 3,2-3,5) для оставшейся части процесса, чтобы помочь избежать загрязнения, а также получить другие желательные результаты (первое значение pH может быть выше или ниже, чем второе значение pH). В некоторых вариантах осуществления pH изменяют от первого значения pH до второго значения pH после того, как достигается желаемое накопление биомассы, например, через от 0 часов до 200 часов после начала ферментации, более конкретно через от 12 до 120 часов после начала ферментации, более конкретно через от 24 до 72 часов после начала ферментации.

В одном варианте осуществления уровень влажности культуральной среды должен быть подходящим для микроорганизма, представляющего интерес. В дополнительном варианте осуществления уровень влажности может составлять от 20 до 90 %, предпочтительно, от 30 до 80 %, более предпочтительно, от 40 до 60%.

Процессы культивирования по настоящему изобретению могут быть анаэробными, аэробными или их комбинацией. Предпочтительно, процесс является аэробным, при поддержании концентрации растворенного кислорода выше 10 или 15 % от насыщения во время ферментации, но в пределах 20 % в некоторых вариантах осуществления или в пределах 30 % в некоторых вариантах осуществления.

Преимущественно система обеспечивает легкую оксигенацию растущей культуры, например, медленным движением воздуха для удаления воздуха с низким содержанием кислорода и введения насыщенного кислородом воздуха. Кислородосодержащий воздух может периодически добавляться в окружающий воздух, например ежедневно.

Кроме того, в систему могут быть добавлены пеногасители для предотвращения образования и/или накопления пены, когда газ образуется во время культивирования и ферментации.

В одном варианте осуществления композицию на основе микроорганизмов не нужно дополнительно обрабатывать после ферментации (например, дрожжи, метаболиты и оставшиеся источники углерода не нужно отделять от софоролипидов). Физические свойства конечного продукта (например, вязкость, плотность и т. д.) также можно регулировать с использованием различных химических веществ и материалов, известных в данной области техники.

В одном варианте осуществления культуральная среда, используемая в заявленной системе, может содержать дополнительные питательные вещества для микроорганизма. Как правило, они включают источники углерода, белки, жиры или липиды, источники азота, микроэлементы и/или факторы роста (например, витамины, регуляторы pH). Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что концентрация питательных веществ, содержание влаги, pH и т.п. могут модулироваться для оптимизации роста для конкретного микроорганизма.

Источник липидов может включать масла или жиры растительного или животного происхождения, которые содержат свободные жирные кислоты или их соли, или их сложные эфиры, включая триглицериды. Примеры жирных кислот включают свободные и этерифицированные жирные кислоты, содержащие от 16 до 18 атомов углерода, гидрофобные источники углерода, пальмовое масло, животные жиры, кокосовое масло, олеиновую кислоту, соевое масло, подсолнечное масло, масло канолы, стеариновую и пальмитиновую кислоты, но не ограничиваются ими.

Культуральная среда заявленной системы может дополнительно содержать источник углерода. Источником углерода обычно является углевод, такой как глюкоза, ксилоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, галактоза, манноза, маннит, сорбоза, рибоза и мальтоза; органические кислоты, такие как уксусная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота и/или пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, изопропил, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, эритритол, изобутанол, ксилитол и глицерин; жиры и масла, такие как масло канолы, соевое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и льняное масло; и т.п. Другие источники углерода могут включать арбутин, рафинозу, глюконат, цитрат, мелассу, гидролизированный крахмал, экстракт картофеля, кукурузный сироп и гидролизированный целлюлозный материал. Указанные выше источники углерода могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

В одном варианте осуществления факторы роста и микроэлементы для микроорганизмов включены в культуральную среду системы. Это особенно предпочтительно при культивировании микроорганизмов, которые не способны вырабатывать все необходимые им витамины. Неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, калий, кальций, медь, марганец, молибден и кобальт; фосфор как например из фосфатов; и другие стимулирующие рост компоненты могут быть включены в культуральную среду заявленных систем. Кроме того, источники витаминов, незаменимых аминокислот и микроэлементов могут быть включены, например, в форме муки или муки крупного помола, таких как кукурузная мука, или в форме экстрактов, таких как дрожжевой экстракт, экстракт картофеля, экстракт говядины, экстракт соевых бобов, экстракт банановой кожуры и тому подобное или в очищенных формах. Аминокислоты, такие как, например, те, которые полезны для биосинтеза белков, также могут быть включены, например, L-аланин.

В одном варианте осуществления также могут быть включены неорганические или минеральные соли. Неорганическими солями могут быть, например, дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, гидрофосфат динатрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид свинца, сульфат меди, хлорид кальция, карбонат кальция, хлорид натрия и/или карбонат натрия. Указанные неорганические соли могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

Культуральная среда заявленной системы может дополнительно содержать источник азота. Источник азота может быть, например, в неорганической форме, такой как нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочевины и хлорид аммония, или в органической форме, такой как белки, аминокислоты, дрожжевые экстракты, дрожжевые автолизаты, кукурузный пептон, гидролизат казеина и соевый белок. Указанные источники азота могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

Микроорганизмы могут быть выращены в планктонной форме или в виде биопленки. В случае биопленки в емкости может быть субстрат, на котором можно выращивать микроорганизмы в состоянии биопленки. Система также может иметь, например, возможность применять стимулы (такие как механическое раздражение), которые стимулируют и/или улучшают характеристики роста биопленки.

Приготовление продуктов на основе микроорганизмов

Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению включают продукты, содержащие микроорганизмы и/или побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов и, необязательно, ростовую среду и/или дополнительные ингредиенты, такие как, например, вода, носители, адъюванты, питательные вещества, модификаторы вязкости, и другие активные агенты.

Одним из продуктов на основе микроорганизмов по настоящему изобретению является просто ферментационная среда, содержащая микроорганизм и/или побочные продукты жизнедеятельности, продуцируемые микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может быть использован непосредственно без экстракции или очистки. При желании экстракция и очистка могут быть легко достигнуты с использованием стандартных методов или методик экстракции, известных специалистам в данной области.

Микроорганизмы в продуктах на основе микроорганизмов могут находиться в активной или неактивной форме и/или в форме вегетативных клеток, спор, мицелия, конидий и/или любой форме пропагул микроорганизмов. Продукты на основе микроорганизмов могут использоваться без дальнейшей стабилизации, консервации и хранения. Преимущественно, прямое использование этих продуктов на основе микроорганизмов сохраняет высокую жизнеспособность микроорганизмов, уменьшает возможность загрязнения посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Микроорганизмы и/или культуральная среда, полученная в результате роста микроорганизмов, могут быть удалены из емкости для выращивания и перенесены, например, через трубопровод для немедленного использования.

В других вариантах осуществления композиция (микроорганизмы, культуральная среда или микроорганизмы и культуральная среда) может быть помещена в контейнеры соответствующего размера, принимая во внимание, например, предполагаемое использование, предполагаемый способ применения, размер ферментационной емкости и любой способ транспортировки от установки для выращивания микроорганизма до места использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещена композиция на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, от 1 до 1000 галлонов или более. В других вариантах осуществления контейнеры имеют объем 2 галлона, 5 галлонов, 25 галлонов или больше.

После получения композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания можно добавлять дополнительные компоненты, когда полученный продукт помещают в контейнеры и/или доставляют по трубам (или иным образом транспортируют для использования). Добавками могут быть, например, буферы, носители, другие композиции на основе микроорганизмов, производимые в той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, питательные вещества для роста растений, отслеживающие агенты, пестициды, гербициды, корма для животных, продукты питания и другие ингредиенты, специфичные для предполагаемого использования.

Преимущественно в соответствии с заявленным изобретением продукт на основе микроорганизмов может содержать бульон, в котором были выращены микроорганизмы. Продукт может представлять собой, например, по меньшей мере, 1 мас. %, 5 мас. %, 10 мас. %, 25 мас. %, 50 мас. %, 75 мас. % или 100 мас. % бульона. Количество биомассы в продукте может составлять, например, от 0 до 100 мас. %, включая все процентные значения в диапазоне между ними.

По желанию, продукт может храниться до использования. Время хранения предпочтительно короткое. Так, время хранения может составлять менее 60 дней, 45 дней, 30 дней, 20 дней, 15 дней, 10 дней, 7 дней, 5 дней, 3 дней, 2 дней, 1 дня или 12 часов. В предпочтительном варианте осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки, продукт хранят при прохладной температуре, такой как, например, менее 20, 15, 10 или 5 °C. С другой стороны, композицию био-ПВА обычно можно хранить при температуре окружающей среды.

Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению могут представлять собой, например, инокулянты микроорганизмов, биопестициды, источники питательных веществ, агенты для ремедиации, продукты для здравоохранения и/или био-ПАВ.

В одном варианте осуществления продукты ферментации (например, микроорганизмы и/или метаболиты), полученные после процесса культивирования, обычно имеют высокую коммерческую ценность. Продукты, которые содержат микроорганизмы, имеют более высокое содержание питательных веществ, чем продукты с дефицитом микроорганизмов. Микроорганизмы могут присутствовать в системе культивирования, бульоне для культивирования и/или культуре биомассы. Бульон для культивирования и/или биомасса могут быть высушены (например, высушены распылением) для получения представляющих интерес продуктов.

В одном варианте осуществления продукты культивирования могут быть получены в виде высушенного распылением продукта биомассы. Биомасса может быть отделена известными способами, такими как центрифугирование, фильтрация, сепарация, декантация, комбинация сепарации и декантации, ультрафильтрация или микрофильтрация. Продукты культивирования биомассы могут быть дополнительно обработаны для облегчения обхода рубца. Продукт биомассы может быть отделен от среды культивирования, высушен распылением и, необязательно, обработан для модулирования обхода рубца и добавлен в корм в качестве источника питательных веществ.

В одном варианте осуществления продукты культивирования могут быть использованы в качестве корма для животных или в качестве пищевой добавки для людей. Продукты культивирования могут быть богаты по меньшей мере одним или несколькими из жиров, жирных кислот, липидов, таких как фосфолипиды, витаминов, незаменимых аминокислот, пептидов, белков, углеводов, стеролов, ферментов и микроэлементов, таких как железо, медь, цинк марганец, кобальт, йод, селен, молибден, никель, фтор, ванадий, олово и кремний. Пептиды могут содержать по меньшей мере одну незаменимую аминокислоту.

В других вариантах осуществления незаменимые аминокислоты инкапсулированы внутри заявленного модифицированного микроорганизма, используемого в процессе культивирования. Незаменимые аминокислоты содержатся в гетерологичных полипептидах, экспрессируемых микроорганизмом. При необходимости гетерологичные пептиды экспрессируются и хранятся в тельцах включения в подходящем микроорганизме (например, грибах).

В одном варианте осуществления продукты культивирования имеют высокое содержание питательных веществ. В результате более высокий процент продуктов культивирования может использоваться в полноценном корме для животных. В одном варианте осуществления кормовая композиция содержит модифицированные продукты культивирования в диапазоне от 15 % корма до 100 % корма.

В настоящем изобретении дополнительно предложены материалы и методы для получения биомассы (например, жизнеспособного клеточного материала), внеклеточных метаболитов (например, как небольших, так и больших молекул) и/или внутриклеточных компонентов (например, ферментов и других белков). Микроорганизмы и побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов по

настоящему изобретению также могут быть использованы для превращения субстрата, такого как руда, где трансформированный субстрат представляет собой продукт.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает продукты на основе микроорганизмов, а также применения указанных продуктов для достижения полезных результатов во многих условиях, включая, например, улучшенную биоремедиацию, добычу полезных ископаемых и добычу нефти и газа; удаление и обработку отходов; улучшение здоровья скота и других животных; и улучшение здоровья и продуктивности растений путем применения одного или нескольких продуктов на основе микроорганизмов.

В конкретных вариантах осуществления системы по настоящему изобретению предоставляют научно обоснованные решения, которые улучшают производительность сельского хозяйства, например, повышая жизнеспособность сельскохозяйственных культур; повышая урожайность; усиливая иммунные реакции растений; повышая устойчивость к насекомым, вредителям и болезням; борясь с насекомыми, нематодами, болезнями и сорняками; улучшая питание растений; увеличивая содержание питательных веществ в сельскохозяйственных, лесных, и пастбищных почвах; и содействуя улучшенному и более эффективному использованию воды.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу улучшения здоровья растений и/или увеличения урожайности путем применения раскрытой в данном документе композиции к почве, семенам или частям растения. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ увеличения урожайности сельскохозяйственных культур или растений, включающему многократное применение композиции, описанной в настоящем документе.

Преимущественно, указанным способом можно эффективно бороться с нематодами и соответствующими заболеваниями, вызванными вредителями, вместе с тем достигать увеличение урожайности и избегать побочных эффектов и дополнительных затрат.

В другом варианте осуществления способ получения побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов может дополнительно включать стадии концентрирования и очистки побочного продукта, представляющего интерес.

В одном варианте осуществления в заявленном изобретении дополнительно предложена композиция, содержащая, по меньшей мере, один тип микроорганизма и/или, по меньшей мере, один побочный продукт жизнедеятельности микроорганизма, продуцируемый указанным микроорганизмом. Микроорганизмы в композиции могут

находиться в активной или неактивной форме на основе микроорганизмов могут находиться в активной или неактивной форме и/или в форме вегетативных клеток, спор, мицелия, конидий и/или любой форме пропагул микроорганизмов. Композиция может содержать или не содержать ростовую матрицу, в которой были выращены микроорганизмы. Композиция также может быть в сухой форме или в жидкой форме.

В одном варианте осуществления композиция подходит для сельского хозяйства. Например, композиция может быть использована для обработки почвы, растений и семян. Композиция также может быть использована в качестве пестицида.

В одном варианте осуществления в заявленном изобретении дополнительно предложено адаптация материалов и способов в соответствии с местными потребностями. Например, способ культивирования микроорганизмов может быть использован для выращивания тех микроорганизмов, которые расположены в местной почве или в конкретной нефтяной скважине, или в месте загрязнения. В конкретных вариантах осуществления местные почвы могут быть использованы в качестве твердых субстратов в способе культивирования для обеспечения естественной среды роста. Преимущественно, указанные микроорганизмы могут быть полезными и более приспособленными к местным потребностям.

Способ культивирования в соответствии с настоящим изобретением не только существенно увеличивает выход микробных продуктов на единицу питательной среды, но также упрощает процесс производства. Кроме того, процесс культивирования может устранить или уменьшить необходимость в концентрировании микроорганизмов после завершения ферментации.

Преимущественно, способ не требует сложного оборудования или высокого энергопотребления и, таким образом, снижает капитальные и трудовые затраты на производство микроорганизмов и их метаболитов в крупных масштабах.

Побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов

Способы и системы по настоящему изобретению можно использовать для получения полезных побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, таких как, например, био-ПАВ, ферменты, кислоты, биополимеры, растворители и/или другие метаболиты микроорганизмов. В конкретных вариантах осуществления побочный продукт жизнедеятельности представляет собой био-ПАВ. Еще более конкретно, побочным продуктом жизнедеятельности может быть био-ПАВ, выбранный

из сурфактина, софоролипидов (SLP), рамнолипидов (RLP) и липидов маннозилэритрита (MEL).

Био-ПАВ представляют собой структурно разнообразную группу поверхностно-активных веществ, продуцируемых микроорганизмами. Био-ПАВ являются биоразлагаемыми и могут легко и дешево производиться с использованием выбранных организмов на возобновляемых субстратах. Большинство организмов, продуцирующих био-ПАВ, продуцируют био-ПАВ в ответ на присутствие источника углеводов (например, масел, сахара, глицерина и т. д.) в ростовой среде. Другие компоненты среды, такие как концентрация железа, также могут значительно влиять на продукцию био-ПАВ. Например, продукция RLP бактериями *Pseudomonas aeruginosa* может быть увеличена, если в качестве источника азота используется нитрат, а не аммоний. Также на выработку рамнолипидов может сильно повлиять концентрация железа, магния, натрия и калия; соотношение углерод:фосфор и перемешивание.

Все биоПАВ являются амфифильными. Они состоят из двух частей: полярного (гидрофильного) фрагмента и неполярной (гидрофобной) группы. Благодаря своей амфифильной структуре био-ПАВ увеличивают площадь поверхности гидрофобных нерастворимых в воде веществ, увеличивают биодоступность таких веществ в воде и изменяют свойства поверхности бактериальных клеток.

Био-ПАВ включают гликолипиды с низкой молекулярной массой (например, рамнолипиды, софоролипиды, липиды маннозилэритрита), липопептиды (например, сурфактин), флаволипиды, фосфолипиды и полимеры с высокой молекулярной массой, такие как липопротеины, липополисахарид-белковые комплексы и комплексы полисахарид-белок-жирная кислота. Обычно липофильным фрагментом молекулы био-ПАВ является углеводородная цепь жирной кислоты, тогда как гидрофильная часть образована сложноэфирными или спиртовыми группами нейтральных липидов, карбоксилатной группой жирных кислот или аминокислот (или пептидов), органической кислотой в случае флаволипидов или углеводом в случае гликолипидов.

Био-ПАВ микроорганизмов вырабатываются различными микроорганизмами, такими как бактерии, грибы и дрожжи. Типичные микроорганизмы, продуцирующие био-ПАВ, включают виды *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. syringae*); *Flavobacterium* spp.; *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*); *Wickerhamomyces* spp., *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. torulopsis*); *Rhodococcus* spp.; *Arthrobacter* spp.; *campylobacter* spp.;

cornybacterium spp.; *Pichia* spp.; *Starmerella* spp. и так далее. Био-ПАВ могут быть получены известными в данной области техники способами ферментации.

Другие штаммы микроорганизмов, включая, например, другие штаммы грибов, например, способные накапливать значительные количества гликолипидных био-ПАВ, и/или штаммы бактерий, например, способные накапливать сурфактин в значительных количествах, могут быть использованы в соответствии с заявленным изобретением. Другие метаболиты, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают маннопротеин, бета-глюкан и другие биохимические вещества, которые обладают биоэмульгирующими свойствами и способствуют снижению поверхностного/межфазного натяжения.

В одном варианте осуществления заявленного изобретения био-ПАВ, продуцируемые заявленными системами, включают сурфактин и гликолипиды, такие как рамнолипиды (RLP), софоролипиды (SLP), трегалозные липиды или липиды маннозилеритрита (MEL). В конкретных вариантах осуществления заявленная система используется для продуцирования SLP и/или MEL в крупном масштабе.

Софоролипиды представляют собой гликолипидные био-ПАВ, продуцируемые, например, различными дрожжами кланды *Starmerella*. Среди дрожжей кланды *Starmerella*, которые были исследованы, наибольший выход софоролипидов был зарегистрирован для *Candida apicola* и *Starmerella bombicola*. SLP состоят из дисахаридной софорозы, связанной с длинноцепочечными гидрокси-жирными кислотами. Указанные SLP являются частично ацетилированными 2-O- β -D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозными единицами, соединенными β -гликозидной связью с 17-L-гидроксиоктадекановой или 17-L-гидрокси- Δ^9 -октадеценновой кислотой. Гидрокси жирная кислота обычно содержит 16 или 18 атомов углерода и может содержать одну или несколько ненасыщенных связей. Карбоксильная группа жирной кислоты может быть свободной (кислотная или открытая форма) или внутренне эстрифицированной в положении 4" (форма лактона).

Липиды маннозилеритрита представляют собой класс био-ПАВ гликолипидов, продуцируемых различными штаммами дрожжей и грибов. Эффективная продукция MEL ограничена в основном родом *Pseudozyma*, со значительной изменчивостью среди структур MEL, продуцируемых каждым видом. MEL содержат 4-O-b-D-маннопиранозил-эритрит в качестве фрагмента сахара или гидрофильной единицы. В соответствии со степенью ацетилирования в положениях C-4' и C-6' в маннопиранозиле, MEL классифицируются как MEL-A, MEL-B, MEL-C и MEL-D.

MEL-A представляет собой диацетилированное соединение, тогда как MEL-B и MEL-C являются моноацетилированными по C-6' и C-4', соответственно. Полностью деацетилированная структура характерна MEL-D. Вне рода *Pseudozyma*, недавно выделенный штамм, *Ustilago scitaminea*, показал обильную продукцию MEL-B на соке сахарного тростника. MEL действуют как эффективные местные увлажнители и могут восстановить поврежденные волосы. Кроме того, было показано, что указанные соединения проявляют как защитную, так и заживляющую активность, активируют фибробласты и сосочковые клетки и действуют как природные антиоксиданты.

Из-за структуры и состава био-ПАВ SLP и MEL обладают превосходными свойствами снижения поверхностного и межфазного натяжения, а также другими полезными биохимическими свойствами, которые могут быть полезны в таких применениях, как крупномасштабное использование в промышленности и сельском хозяйстве, а также в других областях, включая косметику, товары для дома, и здравоохранение, медицину и фармацевтику, но не ограничиваясь ими.

Био-ПАВ накапливаются на границах раздела, тем самым уменьшая межфазное натяжение и приводя к образованию агрегированных мицеллярных структур в растворе. Безопасные, эффективные био-ПАВ микроорганизмов снижают поверхностное и межфазное натяжение между молекулами жидкостей, твердых веществ и газов. Способность био-ПАВ образовывать поры и дестабилизировать биологические мембраны позволяет использовать их в качестве антибактериальных, противогрибковых и гемолитических агентов. В сочетании с такими характеристиками как низкая токсичность и способность к биологическому разложению, био-ПАВ выгодны для использования в нефтегазовой промышленности для широкого спектра применений в нефтяной промышленности, таких как микробиологическое повышение добычи нефти. Указанные применения включают повышение добычи сырой нефти из нефтесодержащего пласта; стимуляцию нефтяных и газовых скважин (для улучшения притока нефти в ствол скважины); удаление загрязнений и/или засоров таких как парафины, асфальтены и отложения с оборудования такого как стержни, трубы, хвостовики, резервуары и насосы; предотвращение коррозии нефтегазодобывающего и транспортного оборудования; снижение концентрация H_2S в сырой нефти и природном газе; снижение вязкости сырой нефти; переработку тяжелой сырой нефти и асфальтенов на более легкие углеводородные фракции; очистку резервуаров, нефтепроводов и трубопроводов; повышение подвижности нефти во время обводнения

скважины не смотря на селективное и неселективное закупоривание; и жидкости для гидроразрыва, но не ограничиваются ими.

При использовании в нефтегазовой отрасли, системы по настоящему изобретению могут быть использованы для снижения стоимости нефтепромысловых композиций на основе микроорганизмов и могут использоваться в сочетании с другими химическими усилителями, такими как полимеры, растворители, фракционный песок и гранулы, эмульгаторы, поверхностно-активные вещества, и другие материалы, известные в данной области техники.

Био-ПАВ, полученные в соответствии с заявленным изобретением, могут быть использованы для других целей, не связанных с добычей нефти, включая, например, очистку трубопроводов, реакторов и других механизмов или поверхностей, а также для борьбы с вредителями, например, при применении к растениям и/или их окружающей среде. Некоторые био-ПАВ, полученные в соответствии с заявленным изобретением, можно использовать для борьбы с вредителями, поскольку они способны проникать через ткани вредителей и эффективны в небольших количествах без использования адъювантов. Было обнаружено, что при концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицелл, био-ПАВ способны более эффективно проникать в обработанные объекты.

Для борьбы с вредителями можно использовать организмы, продуцирующие био-ПАВ в качестве агентов биологической борьбы, или био-ПАВ как таковые. Кроме того, бороться с вредителями можно путем использования специфических субстратов для поддержания жизнедеятельности организмов, продуцирующих био-ПАВ, а также для продукции био-ПАВ пестицидных агентов. Преимущественно, природные био-ПАВ способны ингибировать рост конкурирующих организмов и усиливать рост специфических организмов, продуцирующих био-ПАВ.

Кроме того, указанные био-ПАВ могут играть важную роль в лечении заболеваний животных и человека. Животных можно лечить, например, погружением или купанием в растворе био-ПАВ отдельно, с клеточной массой микроорганизмов или без нее, и/или в присутствии других соединений, таких как медь или цинк.

Композиции, полученные в соответствии с настоящим изобретением, имеют преимущества перед одними био-ПАВ благодаря использованию всей клеточной культуры, включая высокие концентрации маннопротеина в качестве части внешней поверхности клеточной стенки дрожжей (маннопротеин является высокоэффективным биоэмульгатором, способным достигать индекса эмульгирования до 80 %); наличие

биополимера бета-глюкана (эмульгатора) в клеточных стенках дрожжей; наличие в культуре софоролипидов, являющихся мощным био-ПАВ, способным снижать поверхностное и межфазное натяжение; и наличие в культуре метаболитов (например, молочной кислоты, этанола и т. д.). Указанные композиции, среди многих других применений, могут действовать как био-ПАВ и могут обладать свойствами, снижающими поверхностное/межфазное натяжение.

Культивирование био-ПАВ микроорганизмов в соответствии с уровнем техники представляет собой сложный, длительный и ресурсоемкий процесс, требующий нескольких стадий. В заявленном изобретении предложено оборудование, устройства, способы и системы, которые упрощают и удешевляют этот процесс. В заявленном изобретении также предложены новые композиции и применения указанных композиций.

ПРИМЕРЫ

Более глубокое понимание настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ можно получить из следующих примеров, приведенных в качестве иллюстрации. Следующие примеры иллюстрируют некоторые способы, применения, варианты осуществления и варианты настоящего изобретения. Они не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение. Многочисленные изменения и модификации могут быть сделаны в отношении изобретения.

ПРИМЕР 1 – СИСТЕМА ФЕРМЕНТАЦИИ СО МНОЖЕСТВОМ РЕЗЕРВУАРОВ

Был сконструирован переносной пластиковый реактор с возможностью распределения как показано на **Фигурах 1 и 2**. Реактор имеет два пластиковых квадратных резервуара с двумя контурами для массообмена между указанными двумя резервуарами.

Верхняя часть системы оснащена насосным механизмом для извлечения содержимого из первого резервуара и размещения его во втором резервуаре, что составляет один из контуров. Другой контур расположен в нижней части резервуара и выравнивает объемы в резервуарах за счет гидростатического давления.

Добавление отфильтрованного воздуха в резервуары контролировали барботажным механизмом, который проходил через барботер. Отфильтрованный воздух для барботирования создавался водной насосной системой большого объема. На каждый резервуар приходилось по два 72-дюймовых барботера, в результате чего на систему в целом приходилось четыре. Воздушный компрессор также использовался для

добавления отфильтрованного воздуха в верхний и нижний контур для дополнительной аэрации.

Верхний контур был оснащен смотровым стеклом для наблюдения за мутностью, цветом, толщиной и другими характеристиками культуры. Реактор имел рабочий объем 750 - 850 л для выращивания дрожжей *Starmerella* для получения клеток и метаболитов (однако размер и масштаб могут варьироваться в зависимости от требуемого применения). Реактор особенно хорошо подходит для массового производства дрожжей кланды *Starmerella* в малых или крупных масштабах.

В целях дальнейшего снижения стоимости производства культуры и обеспечения масштабируемости технологии система не была стерилизована с использованием традиционных методов. Вместо этого использовался метод санации пустых сосудов, который включал обработку внутренних поверхностей 2-3% перекисью водорода и промывание дезинфицирующим раствором и горячей водой под высоким давлением. Кроме того, чтобы уменьшить вероятность загрязнения, вода, используемая для приготовления культуры, была отфильтрована через 0,1-микронный фильтр.

Компоненты культуральной среды обеззараживали при температуре 85-90 °C или растворяли в 3 % перекиси водорода (сухие компоненты и H₂O в соотношении 1:3 по объему), кроме нефти, которую обеззараживали только температурой.

Температура ферментации обычно должна составлять примерно от 23 до 37 °C, и предпочтительно примерно от 25 до 30° C.

Уровень pH должен быть примерно от 3 до 5, и предпочтительно от примерно 3,5 до примерно 4,5. Кроме того, чтобы еще больше снизить вероятность загрязнения, процесс культивирования начинали при pH 4,0-4,5 и затем проводили при среднем pH 3,2-3,5.

При этих условиях культивирования, промышленно полезное получение биомассы, софоролипидов и других метаболитов достигали ферментацией от 60 до 120 часов. По завершении ферментации культура может быть применена для различных промышленных целей.

ПРИМЕР 2 – КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *STARMERELLA* В РЕАКТОРЕ СО МНОЖЕСТВОМ РЕЗЕРВУАРОВ

Культуральная среда, приготовленная в фильтрованной воде, состоит из 20-100 г/л глюкозы, 0-50 г/л (может изменяться, например, в зависимости от желаемого

количества био-ПАВ, который должен быть получен) масла канолы, 5 г/л дрожжевого экстракта, 4 г/л NH_4Cl , 1 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л NaCl и 0,5 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Начальный pH доводили до примерно 4,5 с помощью 6 N KOH. Культуры выращивали при примерно 25 °C. Время культивирования составляло до 120 ч и pH реакторных культур доводили до примерно 3,5 два раза в день путем добавления 1,0 M NaOH.

При этих условиях культивирования количество влажной биомассы *Starmerella* достигало 100 г на литр культуры.

ПРИМЕР 3 – ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСЕВНОЙ КУЛЬТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИБИОТИКОВ.

Ниже приведен один пример способа крупномасштабного приготовления продуктов на основе микроорганизмов в соответствии с заявленным изобретением. Посевная культура может быть подготовлена и затем увеличена в объеме для использования в заявленных системах. Поэтапное увеличение объема может происходить в отдельной емкости, например, путем добавления компонентов в смеситель барабанного типа и выращивания культуры в течение 2 или более дней. После того, как посевная культура росла в течение как минимум 2 дней в смесителе, культуру можно было разделить на подходящее количество частей для инокуляции любого количества заявленных систем реакторов.

Состав культуральной среды

Компонент	Вес (г/л)
Дрожжевой экстракт	5
Глюкоза	100
Мочевина	1
Стрептомицин (антибиотик)	0,1
Окситетрациклин (антибиотик)	0,01

Качалочные колбы

Были приготовлены два литра состава культуральной среды без антибиотиков в колбах объемом 4 л. Затем колбы подготавливали для автоклавирования. Отрез марли, а затем отрез синей автоклавной бумаги прикрепляли к горлышку колб с помощью резиновой ленты. (отрезы марли и синей бумаги должны быть достаточно большими, чтобы марля и бумага выходили за пределы, где резиновая лента прикрепляет их к

горлышку). Автоклавные циклы происходили при 121 °С в течение 20 минут, затем колбам давали остыть до 30 °С или ниже.

Затем антибиотики взвешивали и растворяли в деионизированной воде в мерном стакане или конической пробирке объемом 50 мл. Чашки с агаром были помечены *C. bombicola* или *S. bombicola*. Отдельные колонии отбирали из чашки петлей (должно быть достаточно одной-двух петель) в условиях асептики, и колбы инокулировали в вытяжном шкафу в лаборатории. Растворенные антибиотики также добавляли в колбы. При снятии и замене марли и синей автоклавной бумаги в вытяжном шкафу следили за тем, чтобы не касаться нижней части марли, которая направлена внутрь колбы.

После инокуляции колб объемом 4 л их помещали на качалку в комнате для ферментации. Температуру на качалке устанавливали на 30 °С. Колбы оставляли для ферментации в течение, по меньшей мере, 2 дней перед использованием посевной культуры. Образцы инокулята посевной культуры отбирали в вытяжном шкафу перед использованием, чтобы убедиться, что инокулят чистый и без загрязнения. Препараты образцов на предметном стекле делали с использованием простого окрашивания по Грамму.

Поэтапное увеличение объема с использованием смесителя барабанного типа

После выращивания посевной культуры в течение 2 дней, посевную культуру увеличивали в объеме в темном смесителе барабанного типа для инокуляции реакторов. Сухие компоненты, перечисленные выше, взвешивали для партии на 40 л. Антибиотики взвешивали и хранили в отдельной таре.

Компоненты культуральной среды растворяли в бутылки объемом 40 л, убедившись, что объем не превышает уровень 40 л. 40 л культуральной среды добавляли в смеситель, затем 2 л инокулята с качалки и соответствующее количество растворенных антибиотиков. Затем культуру выращивали в смесителе в течение по меньшей мере 2 дней перед тем, как ее части переносили в реакторы. Количество культуры, разделенное для каждого резервуара, зависело от того, сколько литров культуры было произведено и количества резервуаров для запуска. В каждый реактор вносили не менее 10 л культуры.

Увеличенную в объеме культуру собирали с использованием роторного насоса в бутылки объемом 20 или 40 л в зависимости от того, какой объем культуры требуется

для реактора. Культуру затем переносили из бутылей тем же роторным насосом, которым инокулировали реакторы.

Очистка смесителя барабанного типа

После сбора всей культуры из смесителя барабанного типа, содержимое смесителя сливали, промывали теплой водой, стараясь удалить любую биопленку. После тщательного промывания использовали 70% изопропиловый спирт для стерилизации реактора. Смесителю давали высохнуть, и когда не оставалось остатков изопропилового спирта, можно было загружать следующую партию посевной культуры.

ПРИМЕР 3 – РАБОТА РЕАКТОРА СО МНОЖЕСТВОМ РЕЗЕРВУАРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ АНТИБИОТИКИ

Культуральная среда

Компонент	Вес (г/л)
Мочевина	1
Дрожжевой экстракт	5
Глюкоза	60
Масло канолы	70 мл/л
Стрептомицин (антибиотик)	0,1
Окситетрациклин (антибиотик)	0,01

Подготовка реактора со множеством резервуаров

Общий объем реактора с двумя резервуарами составлял 750 л, поэтому определяли и взвешивали соответствующее количество компонентов, указанных выше. Сухие компоненты растворяли в баке с использованием отфильтрованной воды. Масло канолы не добавляли на стадии растворения. Антибиотики хранили отдельно и растворяли в деионизированной воде в большом мерном стакане.

Далее растворенную культуральную среду добавляли в реактор. Реактор заполняли до ~ 185 галлонов отфильтрованной водой, затем добавляли масло канолы. Конечный объем составлял 100 галлонов в каждом резервуаре, что суммарно равнялось 200 галлонам.

Начальная температура составляла, по меньшей мере, 23 °C, но не выше, чем

30 °С. После того, как температуру установили в диапазоне от 23 до 30 °С, из смесителя добавляли инокулят с последующим добавлением растворенных антибиотиков. Отбирали образцы для измерения pH и процента растворённого кислорода (DO %). Культуру выращивали в течение минимум ~ 3 дней, мониторя pH, температуру и процент растворённого кислорода (DO %) по крайней мере один раз в день. После того, как резервуар был готов для сбора, отбирали образец для измерения pH.

Делали препараты на предметном стекле, серийные разведения на чашках, и измеряли оптическую плотность (OD) для контроля качества/гарантий. Также измеряли растворённый кислород и температуру. После того, как удостоверились в качестве культуры, культуру собирали с помощью штуцера в нижнем контуре и насоса для перекачки, оборудованного двумя комплектами шлангов.

В случае, если партия культуры была непригодного для использования качества, в два резервуара реактора наливали по полбутылки дезинфицирующего раствора и выдерживали в течение 20 минут, а затем сливали.

Очистка реактора

Сначала резервуары реактора промывали. Реактор отсоединяли от стены, оба нижних шаровых крана закрывали, и нижний контур аппарата удаляли путем отсоединения от штуцеров. При снятии нижнего контура были предприняты меры, чтобы не допустить проливания слишком большого количества культуральной среды. Использовали подъёмную транспортную платформу для перемещения реактора с отсоединённым контуром к сливу на складе.

Затем удаляли верхний контур, а компоненты нижней петли промывали горячей водой. Если указанные контуры или их компоненты были слишком грязными, для их тщательной очистки использовали дезинфицирующее средство. Далее резервуары ополаскивали горячей водой с помощью распылительной насадки на шланге на складе рядом со сливом. Следили за тем, чтобы удалить любую пленку внутри резервуаров.

Далее внутреннюю часть резервуаров покрывали туманом 3 % перекиси водорода (H_2O_2) на протяжении по крайней мере 3-5 минут. На этом этапе одевание индивидуальных защитных средств (PPE) является критическим.

Примечание: Если подозревали загрязнение, реактор перемещали обратно в рабочее положение и резервуары заполняли 0,5 % раствором перекиси водорода. Общий объем реактора составлял примерно 1100 л, поэтому требовалось примерно 55

л 10 % перекиси водорода. Присоединяли нижний контур и включали устройство. Полная очистка реактора длилась по меньшей мере 4 часа при использовании 0,5 % перекиси водорода. По прошествии по меньшей мере 2 часов устройство выключали. Шаровые краны нижнего контура закрывали и нижний контур отсоединяли. Использовали подъёмную транспортную платформу для перемещения устройства к месту слива для сливания.

Затем реактор тщательно промывали отфильтрованной (предпочтительно горячей) водой, и он был готов к загрузке следующей партии.

ПРИМЕР 4 – РАЗЖИЖЕНИЕ ПАРАФИНА

Эксперимент проводили, чтобы показать эффективность культуры *Starmerella* в разжижении парафина. Результаты эксперимента показаны на Фигуре 2, и результаты применения культуры помечены как «Star 3».

Двадцать один (21) продукт микробного и химического эмульгирования (в том числе коммерческие) исследовали на эффективность разложения парафина. В эксперименте использовали пробирки фирмы Falcon на пятьдесят (50) мл с рабочим объемом 25 мл. Твердый парафин был получен из месторождения нефти. Четыре (4,0) грамма твердого парафина взвешивали, а затем добавляли в каждую пробирку Falcon, туда же добавляли по 20 мл жидкой среды по Таблице 1. Все пробирки Falcon затем горизонтально помещали в инкубатор ENVIRO GENE при температуре от 30 до 40 °C и осторожно перемешивали. Пробирки отбирали и анализировали после разного времени инкубации (1, 2 или 4 дня).

Проводили три (3) серии экспериментов с разным временем инкубации и при разной температуре. Первую серию экспериментов выполняли при 30 °C. В этой серии экспериментов «Star3» содержал *S. bombicola* и около 4 г/л софоролипидов (приблизительный уровень насыщения). Обработка «Star3» дала полное растворение в пробирках и была единственной добавкой, которая привела к полному превращению парафина в жидкость, в то время как во всех других тестах парафин сохранял твердую форму (в том числе при использовании коммерческого Naxan). Это доказательство концепции эксперимента показало, что культура *Starmerella* может быть очень эффективна для разжижения парафина, и даже превосходит другие коммерчески доступные химические и биологические препараты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

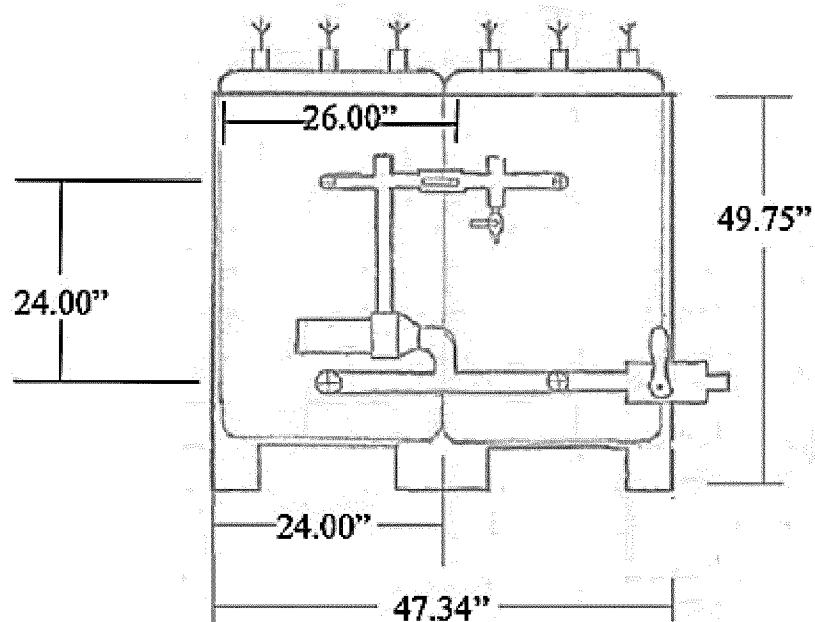
1. Система для получения композиции на основе микроорганизмов, содержащая:
реактор, содержащий первый резервуар и второй резервуар;
5 насос, имеющий вход, соединенный с первым резервуаром через первую трубку, и выход, соединенный со вторым резервуаром через вторую трубку;
третью трубку, соединяющую второй резервуар с первым резервуаром, причем
указанная третья трубка пригодна для обеспечения возможности перемещения
жидкости под гидростатическим давлением из второго резервуара в первый резервуар.
- 10 2. Система по п. 1, дополнительно содержащая один или несколько нагнетателей воздуха или воздушных компрессоров, причем один или несколько нагнетателей воздуха или компрессоров соединены с одним или несколькими газовыми инжекторами, барботерами и/или распылителями.
3. Система по п. 1, в которой рабочий объем реактора составляет от 10 до 40000
15 галлонов.
4. Система по п. 1, дополнительно содержащая каркас для поддержки компонентов системы.
5. Система по п. 1, дополнительно содержащая колеса и ручки для маневрирования системы.
- 20 6. Система по п. 1, отличающаяся тем, что система сконфигурирована на задней части грузового прицепа и/или полуприцепа, и/или тем, что система является переносной.
7. Система по п. 1, в которой на одном или нескольких насосах может быть установлен коэффициент рециркуляции в диапазоне от 30 до 0,1, или до 200 галлонов в
25 минуту.
8. Способ культивирования микроорганизма без загрязнения, отличающийся тем, что указанный способ включает:
добавление питательной среды, содержащей воду и питательные
компоненты, к системе по п. 1 с использованием перистальтического насоса;
30 инокуляцию системы жизнеспособным микроорганизмом; и
необязательно, добавление противомикробного агента в систему.
9. Способ по п. 8, где микроорганизм представляет собой дрожжи.
10. Способ по п. 9, где микроорганизм представляет собой *Starmerella bombicola*.

11. Способ по п. 9, где микроорганизм представляет собой *Pseudozyma aphidis*.
12. Способ по п. 8, отличающийся тем, что систему по п. 1 стерилизуют перед культивированием микроорганизма.
13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что стерилизация включает:
- 5 промывание внутренних поверхностей реактора коммерческим дезинфицирующим средством;
- покрытие туманом внутренней части реактора 3 % раствором перекиси водорода; и
- 10 обработку паром внутренней части реактора водой при температуре от 105 °С до 110 °С.
14. Способ по п. 8, отличающийся тем, что культуральную среду обеззараживают перед добавлением в систему.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что обеззараживание достигают путем:
- 15 автоклавирования компонентов питательной среды;
- фильтрации воды с использованием 0,1-микронного фильтра для воды; и
- УФ стерилизации воды.
16. Способ по п. 8, в котором питательные компоненты включают один или несколько источников углеводов, один или несколько источников липидов, одну или несколько минеральных солей, один или несколько источников микроэлементов и
- 20 один или несколько источников азота.
17. Способ по п. 8, в котором противомикробный агент представляет собой антибиотик или софоролипид в чистом виде.
18. Композиция, содержащая микроорганизм и/или один или несколько продуктов жизнедеятельности этого микроорганизма.
- 25 19. Композиция по п. 18, в которой микроорганизм представляет собой дрожжи.
20. Композиция по п. 19, в которой микроорганизм представляет собой *Starmerella bombicola*.
21. Композиция по п. 19, в которой микроорганизм представляет собой *Pseudozyma aphidis*.
- 30 22. Композиция по п. 20, в которой побочный продукт жизнедеятельности представляет собой био-ПАВ.
23. Композиция по п. 22, в которой био-ПАВ представляет собой софоролипид.
24. Композиция по п. 22, в которой био-ПАВ представляет собой липид маннозилеритрита.

25. Способ увеличения количества нефти, извлекаемой из нефтесодержащего пласта, отличающийся тем, что указанный способ включает применение композиции по п. 18 к нефтесодержащему пласту.
26. Способ очистки стержня, трубопровода и/или обсадной колонны нефтяной скважины, отличающийся тем, что указанный способ включает применение композиции по п. 18 к конструкциям стержня, трубопровода и обсадной колонны нефтяной скважины.
27. Способ улучшения роста, урожайности и/или здоровья растения, отличающийся тем, что указанный способ включает применение композиции по п. 18 к растению или окружающей его среде.
28. Способ борьбы с вредителями животных, отличающийся тем, что указанный способ включает контактирование вредителя с композицией по п. 18.
29. Способ кормления животного, отличающийся тем, что способ включает добавление композиции по п. 18 в корм для животного и/или источник питьевой воды.



ФИГ. 1



ФИГ. 2