

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991886** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.13

(22) Дата подачи заявки
2018.02.12

(51) Int. Cl. *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 3/04 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

**(54) ПЕРЕНОСНОЕ УСТРОЙСТВО И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

(31) 62/457,445

(32) 2017.02.10

(33) US

(86) PCT/US2018/017814

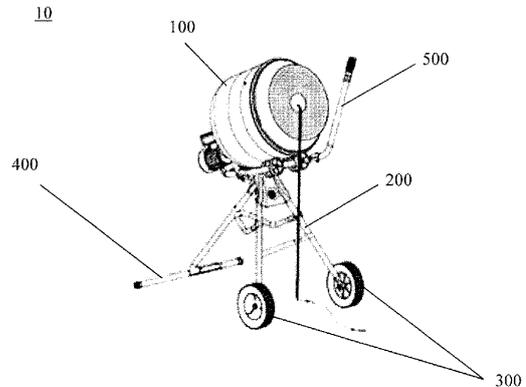
(87) WO 2018/148656 2018.08.16

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

(72) Изобретатель:
**Фармер Шон, Алибек Кен, Диксон
Тайлер (US)**

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

(57) В заявленном изобретении предложены устройства и способы для получения композиций на основе микроорганизмов, которые можно использовать в нефтегазовой промышленности, для очистки окружающей среды, а также для других применений. Устройства и способы могут производить глубинные дрожжевые культуры, которые можно масштабировать, для инокуляции крупномасштабных систем ферментации на месте. Устройство может включать вращающийся барабан, установленный на опорном каркасе, и двигатель, соединенный с барабаном и приводящий барабан во вращение.



201991886 A1

201991886 A1

ПЕРЕНОСНОЕ УСТРОЙСТВО И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США с номером 62/457445, поданной 10 февраля 2017 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, включая любые фигуры, таблицы и чертежи.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 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.

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

25 Существуют две основные формы культивирования микроорганизмов: глубинное культивирование и поверхностное культивирование. Бактерии, дрожжи и грибы могут быть выращены с использованием любого способа. Оба метода культивирования требуют питательную среду для роста микроорганизмов. Питательная среда, которая может находиться либо в жидкой, либо в твердой форме,
30 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.

Сельское хозяйство и нефтяная промышленность - это две отрасли, в которых микроорганизмы могут играть весьма полезную роль, если их можно будет сделать более доступными и, предпочтительно, в более активной форме.

5 Когда сырая нефть течет через скважину, вещества в сырой нефти часто накапливаются на поверхностях эксплуатационных хвостовиков, вызывая снижение потока и даже останавливая добычу в целом. Разнообразные химические вещества и оборудование используют для подавления или предотвращения и устранения этой проблемы, но существует потребность в более качественных продуктах и способах, особенно в более экологически безопасных способах, которые имеют улучшенную
10 эффективность и сниженную токсичность.

Чтобы повысить урожайность и защитить посевы от болезнетворных микроорганизмов, вредителей и болезней, фермеры в значительной степени полагаются на использование химических веществ и химических удобрений; однако при чрезмерном или неправильном применении эти вещества могут стекать в
15 поверхностные воды, вымываться в грунтовые воды и испаряться в воздух. 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.

20 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
25 использует биологические агенты, такие как живые микроорганизмы, биопрепараты, полученные из этих микроорганизмов, и их комбинации в качестве пестицидов. 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.
30 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 системах и системах добычи нефти в достаточных количествах, чтобы они были полезными. Эта проблема усугубляется потерями жизнеспособности и/или активности из-за переработки, составления композиции, хранения, стабилизации до распространения, споруляции вегетативных клеток как средства стабилизации, транспортировки и применения.

Композиции на основе микроорганизмов могли бы помочь удовлетворить эти потребности, если бы были доступны более эффективные способы культивирования для массового производства микроорганизмов и метаболитов микроорганизмов.

10 КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены устройства и способы получения композиций на основе микроорганизмов, которые могут быть использованы в нефтегазовой промышленности, сельском хозяйстве, биоремедиации, культивировании водных организмов и многих других применениях. В частности, в заявленном изобретении предложены способы и материалы для эффективного культивирования микроорганизмов и получения побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. В заявленном изобретении также предложены устройства для такого культивирования и производства.

Более конкретно, в настоящем изобретении предложено устройство для ферментации, которое можно использовать и транспортировать по низкой цене, не требующее специальной подготовки или навыков. В конкретных вариантах осуществления устройство и способы используются для культивирования инокулята дрожжей и грибов, которые затем могут быть использованы в более крупных системах ферментации. В определенных вариантах осуществления устройство и способы используются для производства инокулята дрожжей *Starmerella bombicola*.

В одном варианте осуществления устройство по настоящему изобретению содержит вращающийся барабан, поддерживаемый каркасом, который может иметь колеса. Вращение барабана достигается с помощью двигателя (например, электродвигателя), подключенного к источнику питания (например, устройство может иметь батарею или шнур питания для подключения к внешнему источнику питания). Барабан также может быть соединен с системой аэрации, например, с системой аэрации, содержащей воздушный насос. Она служит для подачи воздуха к поверхности культуры в барабане, а также может служить средством регулирования внутренней температуры.

Перегородки могут быть прикреплены к внутренней поверхности барабана, чтобы помочь в перемешивании и аэрации культуры. Когда барабан вращается, культура перемешивается в нем и насыщается кислородом как из окружающего воздуха, так и воздуха, подаваемого системой аэрации.

5 В предпочтительных вариантах осуществления устройство работает непрерывно на протяжении всего процесса культивирования. Устройство может эксплуатироваться столько времени, сколько необходимо для получения достаточного объема культуры, в зависимости от конкретных видов микроорганизмов. Например, смеситель может работать непрерывно в течение 1, 2, 3, 4, 5 или более дней (или
10 любой их части).

Преимущественно, устройство может эффективно самостоятельно стерилизоваться. Например, микроорганизмы, культивируемые в смесителе, могут быть штаммами, которые продуцируют противомикробные метаболиты или побочные продукты, такие как био-ПАВ. Таким образом, сама культура микроорганизмов может
15 обеспечивать борьбу с нежелательными микроорганизмами в барабане одновременно с культивированием желаемых микроорганизмов.

В предпочтительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы культивирования, которые упрощают производство и облегчают транспортабельность полезных композиций и продуктов на основе микроорганизмов.
20 Способы предусматривают глубинное культивирование композиций микроорганизмов, подходящих для инокуляции крупномасштабных систем ферментации.

Инокулят, полученный с помощью заявленного устройства и способа, можно использовать для инокуляции системы ферментации, присутствующей на месте, для производства больших количеств композиций на основе микроорганизмов. В
25 предпочтительных вариантах осуществления заявленные устройство и способы также могут быть использованы на месте таким образом, что культура инокулята может быть перенесена непосредственно из устройства в систему ферментации на месте.

Преимущественно заявленное изобретение снижает капитальные и трудовые затраты на производство микроорганизмов и их метаболитов. Кроме того, процесс
30 культивирования по настоящему изобретению уменьшает или устраняет необходимость концентрировать или иным образом обрабатывать микроорганизмы после завершения культивирования.

Транспортабельность может привести к значительной экономии средств, поскольку инокуляты для композиций на основе микроорганизмов могут быть

получены на месте предполагаемого использования инокулята или вблизи него. Преимущественно, инокулят может быть произведен на месте с использованием материалов из местных источников, если это желательно, тем самым уменьшая материально-технические препятствия и затраты на транспортирование и доставку.

5 Кроме того, конечные продукты, полученные путем увеличения объема инокулята, могут включать жизнеспособные микроорганизмы во время применения.

Композиции, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы для инокуляции крупномасштабных систем ферментации для использования в широком диапазоне применений в нефтяной промышленности.

10 Указанные применения включают повышение добычи сырой нефти, снижение вязкости нефти, удаление парафина из стержней, трубопроводов, хвостовиков и насосов, ингибирование или предотвращение коррозии нефтяного оборудования, жидкости для гидроразрыва, снижение концентрации H_2S в добытой сырой нефти, а также очистка резервуаров, отводной линии и трубопроводов, но не ограничиваются
15 ими.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **ФИГ. 1** показано устройство в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 В настоящем изобретении предложены устройства и способы получения композиций на основе микроорганизмов, которые могут быть использованы в нефтегазовой промышленности, сельском хозяйстве, биоремедиации, культивировании водных организмов и многих других применениях. В частности, в заявленном изобретении предложены способы и материалы для эффективного культивирования
25 микроорганизмов и получения побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. В заявленном изобретении также предложены устройства для такого культивирования и производства.

Более конкретно, в настоящем изобретении предложено мобильное устройство для ферментации, которое можно использовать и транспортировать по низкой цене, не
30 требующее специальной подготовки или навыков.

В конкретных вариантах осуществления устройство и способы используются для получения инокулята дрожжей и грибов. В определенных вариантах осуществления устройство и способы используются для производства инокулята дрожжей *Starmerella bombicola*.

В одном варианте осуществления устройство по настоящему изобретению содержит вращающийся барабан, поддерживаемый каркасом. Каркас может иметь колеса для простоты передвижения, хотя в этом нет необходимости. Например, устройство может включать два колеса на одной стороне без колес на другой стороне, так что устройство может быть опрокинута для транспортировки с использованием колес и установлено так, чтобы оно оставалось на месте (как показано на Фиг. 1). В качестве альтернативы устройство может включать три или более колес. Вращение барабана достигается с помощью двигателя. Двигатель может работать от электричества или бензина. Предпочтительно двигатель представляет собой электродвигатель, который может быть подключен к источнику питания. Например, устройство может включать аккумулятор в качестве источника питания, или устройство может получать энергию от внешнего источника (например, через шнур питания или посредством беспроводной передачи энергии).

Барабан также может быть соединен с системой аэрации, содержащей, например, воздушный насос. Она служит для подачи воздуха к поверхности культуры в барабане, а также может служить средством регулирования внутренней температуры.

Перегородки могут быть прикреплены к внутренней поверхности барабана, чтобы помочь в перемешивании и аэрации культуры. Когда барабан вращается, культура перемешивается в нем и насыщается кислородом как из окружающего воздуха, так и воздуха, подаваемого системой аэрации.

В предпочтительных вариантах осуществления устройство работает непрерывно на протяжении всего процесса культивирования. Устройство может эксплуатироваться столько времени, сколько необходимо для получения достаточного объема культуры, в зависимости от конкретных видов микроорганизмов. Например, смеситель может работать непрерывно в течение 1, 2, 3, 4, 5 или более дней (или любой их части).

Устройство по настоящему изобретению можно масштабировать в зависимости от предполагаемого использования. Например, объем барабана может варьироваться от нескольких литров до нескольких сотен литров или более.

Преимущественно, устройство может эффективно самостоятельно стерилизоваться. Например, микроорганизмы, культивируемые в смесителе, могут быть штаммами, которые продуцируют противомикробные метаболиты или побочные продукты, такие как био-ПАВ. Таким образом, сама культура микроорганизмов может обеспечивать борьбу с нежелательными микроорганизмами в барабане одновременно с

культивированием желаемых микроорганизмов. Альтернативно или дополнительно, устройство может быть стерилизовано с помощью внешних средств, например, стерилизующего агента, такого как перекись водорода.

5 В предпочтительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы культивирования, которые упрощают производство и облегчают транспортабельность полезных композиций и продуктов на основе микроорганизмов. Способы предусматривают глубинное культивирование композиций микроорганизмов, подходящих для инокуляции крупномасштабных систем ферментации.

10 В определенных вариантах осуществления способ включает добавление в барабан устройства для ферментации по меньшей мере одного типа микроорганизмов и, необязательно, питательных веществ для микроорганизмов; и обеспечивая работу перемешивающего устройства до тех пор, пока не будет получено достаточное количество инокулята. Питательные вещества могут включать, например, один или несколько источников углерода, белков, жиров, источников азота, микроэлементов
15 и/или факторов роста (например, витаминов, регуляторов pH).

Инокулят, полученный с помощью заявленного способа, можно использовать для инокуляции системы ферментации, присутствующей на месте, для производства больших количеств композиций на основе микроорганизмов. В предпочтительных вариантах осуществления заявленное устройство и способы могут быть использованы
20 на месте таким образом, что культура инокулята может быть перенесена непосредственно из устройства в крупномасштабную систему ферментации на месте.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении дополнительно предложена композиция инокулята, содержащая, по меньшей мере, один тип микроорганизма и/или, по меньшей мере, один метаболит микроорганизма,
25 продуцируемый микроорганизмом, который был выращен с использованием устройства 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 заявленное изобретение снижает капитальные и трудовые
30 затраты на производство микроорганизмов и их метаболитов. Кроме того, процесс культивирования по настоящему изобретению уменьшает или устраняет необходимость концентрировать или иным образом обрабатывать микроорганизмы после завершения культивирования.

Транспортабельность может привести к значительной экономии средств, поскольку инокуляты для композиций на основе микроорганизмов могут быть получены на месте предполагаемого использования инокулята или вблизи него. Преимущественно, инокулят может быть произведен на месте с использованием
5 материалов из местных источников, если это желательно, тем самым уменьшая материально-технические препятствия и затраты на транспортирование и доставку. Кроме того, конечные продукты, полученные путем увеличения объема инокулята, могут включать жизнеспособные микроорганизмы во время применения, что может повысить эффективность продукта.

10 Таким образом, в определенных вариантах осуществления заявленное изобретение использует 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,
15 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, могут быть использованы для инокуляции крупномасштабных систем ферментации для
20 использования в широком диапазоне применений в нефтяной промышленности. Указанные применения включают повышение добычи сырой нефти, снижение вязкости нефти, удаление парафина из стержней, трубопроводов, хвостовиков и насосов, ингибирование или предотвращение коррозии нефтяного оборудования, жидкости для гидроразрыва, снижение концентрации H_2S в добытой сырой нефти, а
25 также очистка резервуаров, отводной линии и трубопроводов, но не ограничиваются ими.

Выбранные определения

Используемый в данном документе термин «композиция на основе микроорганизмов» означает композицию, которая содержит компоненты, которые
30 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. Клетки могут находиться в вегетативном состоянии или в форме спор, или в смеси обоих. Клетки могут быть в форме планктона или в форме

био пленки, или в виде смеси обоих. Побочными продуктами жизнедеятельности могут быть, например, метаболиты, компоненты клеточной мембраны, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Клетки могут быть целыми или лизированными. В предпочтительных вариантах осуществления клетки находятся в вегетативном состоянии и 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 клеток на миллилитр композиции.

В заявленном изобретении дополнительно предложены «продукты на основе микроорганизмов» или «продукты культивирования», 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, буферы, подходящие носители, такие как вода, добавленные питательные вещества для поддержки дальнейшего роста микроорганизмов 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.

Термин «инокулят» охвачен термином «продукт на основе микроорганизмов». Используемый в данном документе термин «инокулят» означает продукт на основе микроорганизмов, который можно использовать, например, в качестве посевной культуры для инокуляции более крупномасштабной системы или процесса ферментации. Инокулят может быть увеличен в объеме в такой системе ферментации для получения желаемых количеств композиций и продуктов на основе микроорганизмов.

Используемый в данном документе термин «система ферментации на месте» относится к системе, используемой для получения композиций и/или продуктов на

основе микроорганизмов на месте или вблизи места применения указанных композиций и/или продуктов на основе микроорганизмов.

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

5 Используемый в данном документе термин «борьба» используется в отношении активности, характерной био-ПАВ (на другие активные агенты) или микроорганизмам, продуцирующим био-ПАВ, которая распространяется на уничтожение, потерю активности или иммобилизацию вредителей или иным образом приводит к практической неспособности вредителей причинять вред.

10 Проектирование и эксплуатация перемешивающего устройства

На ФИГ. 1 показано устройство для ферментации в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Как показано на ФИГ. 1, устройство **10** может включать вращающийся барабан **100**, поддерживаемый каркасом **200**. Каркас **200** может иметь колеса **300** для простоты передвижения, хотя это не обязательно.

15 Например, устройство может включать два колеса **300** на одной стороне без колес на другой стороне **400**, так что устройство может быть опрокинута для транспортировки с использованием колес и установлено так, чтобы оно оставалось на месте. Альтернативно, устройство может включать три или более колеса **300** (либо так, что

20 имеется секция **400** без колес). Колеса **300** могут иметь блокиратор колес для удержания устройства на месте, когда оно не транспортируется, особенно в случае, когда все точки контакта с землей — это колеса. Вращение барабана **100** достигается с помощью двигателя. Двигатель может работать от электричества или бензина. Предпочтительно двигатель представляет собой электродвигатель, который может

25 быть подключен к источнику питания. Например, устройство может включать аккумулятор в качестве источника питания, или устройство может получать энергию от внешнего источника (например, через шнур питания или посредством беспроводной передачи энергии). Устройство **10** может быть оснащено средством для регулировки угла наклона барабана **100**. Такие средства могут включать, например, рычаг **500** и/или

30 шарнир или другую вращающуюся опору на каркасе **200**.

В одном варианте осуществления барабан **100** устройства **10** представляет собой закрывающийся вращающийся барабан для удержания, перемешивания и выращивания инокулята глубинной культуры. Барабан может быть изготовлен,

например, из стекла, одного или полимеров, одного или нескольких металлов, одного или нескольких металлических сплавов и/или их комбинаций.

5 Барабан **100** может быть установлен на опорном каркасе **200**. Опорный каркас **200** может иметь колеса **300**, способствующие простой транспортировке всего устройства без необходимости в значительных навыках, обучении, затратах или времени. Колеса **300** могут быть изготовлены, например, из одного или нескольких полимеров, резины или любого прочного материала, пригодного для перемещения по различным ландшафтам, например, в сельскохозяйственных и нефтедобывающих средах. Каркас **200** может быть изготовлен, например, из стекла, одного или из 10 полимеров, одного или нескольких металлов, одного или нескольких металлических сплавов и/или их комбинаций.

Барабан функционально связан с двигателем, таким как электродвигатель, который подключен к источнику питания. Двигатель позволяет барабану вращаться непрерывно со скоростью, например, от 10 до 30 об/мин и, более предпочтительно, от 15 до 25 об/мин. 15

Барабан также может быть соединен с системой аэрации, содержащей, например, воздушный насос. Воздушный насос подает воздух внутрь барабана, тем самым аэрируя поверхность движущейся культуры в барабане. Когда барабан вращается, культура перемешивается в нем и насыщается кислородом из воздуха, подаваемого системой аэрации. В некоторых вариантах осуществления воздух может 20 нагреваться или охлаждаться, чтобы помочь регулировать внутреннюю температуру в барабане и окружающей среды культуры.

Угол наклона оси барабана относительно земли может составлять от 0° до 90° . Угол предпочтительно составляет менее 90° , чтобы увеличить площадь поверхности культурального бульона в барабане. Угол может быть горизонтальным (то есть 0°) или близким к горизонтальному. Угол может составлять, например, от около 5° до около 75° или от около 10° до около 60° . Устройство может быть снабжено средством для регулировки угла наклона. 25

Наряду с оптимизацией угла наклона барабана, форма барабана также 30 предпочтительно оптимизируется таким образом, чтобы максимальная площадь поверхности культуры подвергалась подаче воздуха во время процесса культивирования. Барабан может иметь форму, подобную, например, цилиндру или любого типа модифицированного цилиндра, хотя варианты осуществления не ограничиваются этим. Модифицированные цилиндры могут включать конические

цилиндры, цилиндры в форме тубы или цилиндры, имеющие более широкий диаметр в середине, чем на обоих концах.

Кроме того, на внутренней поверхности барабана могут присутствовать перегородки для правильного перемешивания и аэрации культуры. Предпочтительно от 3 до 4 перегородок равномерно или приблизительно равномерно распределены по внутренней окружности барабана и выровнены так, чтобы располагаться параллельно оси вращения барабана. Альтернативно, перегородки могут быть расположены таким образом, чтобы они были перпендикулярны оси вращения барабана.

В предпочтительных вариантах осуществления устройство работает непрерывно на протяжении всего процесса культивирования. Устройство может эксплуатироваться столько времени, сколько необходимо для получения достаточного объема культуры, в зависимости от конкретных видов микроорганизмов. Например, перемешивающее устройство может работать непрерывно в течение нескольких дней. В конкретных вариантах осуществления перемешивающее устройство работает непрерывно в течение 1, 2, 3, 4 или до 5 дней или более, или любой их части.

В одном варианте осуществления перемешивающее устройство представляет собой мобильный или переносной биореактор, который может быть предусмотрен для производства инокулята на месте, включая подходящее количество желаемого штамма микроорганизма. Количество полученного жидкого инокулята культуры может составлять, например, от 2 до 500 литров, от 5 до 250 литров, от 10 до 100 литров, от 15 до 75 литров, от 20 до 50 литров или от 35 до 40 литров. Поскольку инокулят образуется на месте применения, не прибегая к процессам стабилизации, консервации, хранения и транспортировки традиционного производства, может быть получена гораздо более высокая плотность живых микроорганизмов, что требует гораздо меньшего объема композиции микроорганизмов для использования в системе ферментации 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.

Устройство по настоящему изобретению можно масштабировать в зависимости от предполагаемого использования. Например, объем барабана может варьироваться от нескольких литров до нескольких сотен литров, в зависимости от того, сколько инокулята потребуется для инокуляции конкретной системы ферментации. Барабан может быть, например, от 1 литра до 5000 литров или более. Как правило, объем

барабана может составлять от 10 до 1500 литров, предпочтительно от 50 до 500 литров и более предпочтительно от 100 до 200 литров.

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

10 В одном варианте осуществления устройство имеет свои собственные системы управления и измерения, по меньшей мере, для температуры и рН. В дополнение к мониторингу и контролю температуры и рН, барабан может также иметь возможность для мониторинга и контроля, например, растворенного кислорода, перемешивания, пенообразования, чистоты культур микроорганизмов, продукции желаемых метаболитов и тому подобного.

15 В дополнительном варианте осуществления устройство также может быть способна контролировать 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.

25 В одном варианте осуществления среда для культивирования, воздух и оборудование, используемые в способе и процессе культивирования, являются стерильными. Оборудование для культивирования, такое как реактор/емкость, может быть отделено от стерилизационного устройства, например, от автоклава, но подключено к нему. Оборудование для культивирования также может иметь стерилизационный блок, который стерилизует *in situ* перед началом инокуляции, например, с использованием пара. 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 рН для борьбы с ростом бактерий.

Перед культивированием барабан можно промыть стерилизующим агентом, таким как раствором перекиси водорода (например, от 1,0 % до 3,0 % перекиси водорода); это можно сделать до или после промывки горячей водой, например, при 80-90 градусов Цельсия, чтобы ингибировать или предотвратить загрязнение.

5 Компоненты культуральной среды (например, источник углерода, вода, источник липидов, микроэлементы и т. д.) также могут быть обеззаражены температурой и/или перекисью водорода (возможно, с последующей нейтрализацией перекиси водорода с использованием кислоты, такой как HCl, H₂SO₄ и т. д.).

Преимущественно устройство также может самостоятельно стерилизоваться.

10 Например, микроорганизмы, выбранные для культивирования в перемешивающем устройстве, могут быть штаммами, о которых известно, что они продуцируют противомикробные метаболиты или побочные продукты, такие как био-ПАВ. Таким образом, сама культура микроорганизмов может обеспечивать борьбу с
15 нежелательными микроорганизмами в барабане одновременно с культивированием желаемых микроорганизмов.

Температура культивирования, используемая в соответствии с настоящим изобретением, может составлять, например, приблизительно от 25 до 40 градусов Цельсия, хотя процесс может происходить за пределами этого диапазона. Микроорганизм можно культивировать в диапазоне pH от около 2 до 10 и, более
20 конкретно, в диапазоне pH от около 3 до 5 (путем ручного или автоматического регулирования pH с использованием оснований, кислот и буферов, например, HCl, KOH, NaOH, H₃PO₄). Изобретение также может быть осуществлено за пределами этого диапазона pH.

Культивирование дрожжей может начинаться при первом значении pH
25 (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). Предпочтительных результатов можно достичь, поддерживая концентрацию растворенного кислорода выше 10, 15, 20
30 или 25 % насыщения во время культивирования. В одном варианте осуществления инокулят не нужно дополнительно обрабатывать после ферментации (например, дрожжи, метаболиты и оставшиеся источники углерода не нужно отделять от софоролипидов). Физические свойства (например, вязкость, плотность и т. д.) также

можно регулировать с использованием различных химических веществ и материалов, известных в данной области техники.

Одно или несколько противомикробных веществ могут быть добавлены в культуральную среду (например, стрептомицин, окситетрацилин, софоролипид и рамнолипид) для дополнительного ингибирования или предотвращения загрязнения до, во время или после ферментации. В питательную среду можно добавить один или несколько источников органического и неорганического азота (например, белок, аминокислоты, дрожжевые экстракты, дрожжевые автолизаты, соли аммиака или аммония, мочевины, кукурузный пептон, гидролизат казеина и белок сои).

10 Микроорганизмы

Микроорганизмами, выращенными в соответствии с системами и способами по настоящему изобретению, могут быть, например, бактерии, дрожжи, грибы или многоклеточные организмы. В предпочтительных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи. В особенно предпочтительных вариантах осуществления микроорганизмы представляют собой штаммы кланды *Starmerella*.

В одном варианте осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Указанные бактерии могут быть, например, *Escherichia coli*, *Rhizobium* (например, *Rhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* и *Rhizobium etli*), *Bradyrhizobium* (например, *Bradyrhizobium japonicum* и *B. parasponia*), *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquifaciens*), *Azobacter* (например, *Azobacter vinelandii* и *Azobacter chroococcum*), *Arhrobacter* (например, *Agrobacterium radiobacter*), *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens (Kluuyver)*), *Azospirillum* (например, *Azospirillum brasiliensis*), *Azomonas*, *Dexia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter* (например, *C. xyli subsp. xyli* и *C. xyli subsp. cynodontis*), *cyanobacteria*, *Pantoea* (например, *Pantoea agglomerans*), *Sphingomonas* (например, *Sphingomonas paucimobilis*), *Streptomyces* (например, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces aureus* и *Streptomyces kasugaensis*), *Streptoverticillium* (например, *Streptoverticillium rimofaciens*), *Ralslonia* (например, *Ralslonia eulropha*), *Rhodospirillum* (например, *Rhodospirillum rubrum*), *Xanthomonas* (например, *Xanthomonas campestris*), *Erwinia* (например, *Erwinia carotovora*), *Clostridium* (например, *Clostridium braavidaciens* и *Clostridium malacusomae*) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой гриб (включая дрожжи), включая, например, *Starmerella*, *Mycorrhiza* (например, *vesicular-arbuscular mycorrhizae* (VAM), *arbuscular mycorrhizae* (AM), *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *F usarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (например, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *T. viride* и *T. hamatum*), *Rhizopus* spp, эндофитные грибы (например, *Piriformis indica*), *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii sequela* и *Saccharomyces torula*), *Debaromyces*, *Issalchenkia*, *Kluyveromyces* (например, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*), *Pichia* spp (например, *Pichia pastoris*), и их комбинации, но не ограничиваются ими.

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

Среда для выращивания и культивирования

В заявленном изобретении предложены способы эффективного получения глубинных культур микроорганизмов, которые можно масштабировать. Указанный способ может включать предоставление всех материалов, необходимых для процесса глубинного культивирования, хотя ожидается, что пресная вода будет поступать из местного источника.

В одном варианте осуществления способ включает предоставление жизнеспособных дрожжей или другого микроорганизма в барабане перемешивающего устройства. Могут быть включены различные штаммы, которые способны накапливать значительные количества гликолипидных био-ПАВ. Более конкретно, способ может включать добавление одного или нескольких жизнеспособных штаммов грибов, способных к борьбе с вредителями, биоремедиации, повышению добычи нефти и другим полезным целям, 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 одном варианте осуществления культуральная среда, используемая согласно заявленному изобретению, может содержать дополнительные питательные вещества

для микроорганизма. Как правило, они включают источники углерода, белки и/или жиры, 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.

Каждый из источника углерода, источника липидов, источника азота и/или источника микроэлементов могут предоставляться в отдельной упаковке, которую можно добавлять в барабан перемешивающего устройства в подходящее время в процессе культивирования. 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 культивирования.

Источник липидов может включать, например, 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. Другие источники углерода могут включать один или несколько сахаров, таких как глюкоза, ксилоза, манноза, сахароза, галактоза, маннит, сорбоза, рибоза, арбутин, рафиноза, глицерин, эритрит, ксилит, глюконат, цитрат, меласса, гидролизованный крахмал, кукурузный сироп и гидролизованный целлюлозный материал, включая глюкозу.

Способ может включать добавление одного или нескольких источников микроэлементов, таких как калий, магний, кальций, цинк и марганец, предпочтительно в виде солей, фосфор, такой как из фосфатов, и другие стимулирующие рост компоненты. В питательную среду можно включить один или несколько источников органического и неорганического азота, такие как белки, аминокислоты, дрожжевые экстракты, дрожжевые автолизаты, соли аммиака или аммония, мочевины, кукурузный пептон, гидролизат казеина и белок сои.

Способ может включать добавление одного или нескольких противомикробных веществ для ингибирования или предотвращения загрязнения во время культивирования (например, стрептомицина, окситетрациклина, софоролипида и

рамнолипида). Кроме того, способ может включать обеззараживающие материалы для предварительного культивирования, такие как дезинфицирующий раствор и перекись водорода. Дезинфицирующий раствор и перекись водорода могут поступать в концентрированной форме, а затем разбавляться на месте ферментации перед использованием. Например, перекись водорода может быть предоставлена в концентрированной форме и разбавлена для приготовления 1,0-3,0 % перекиси водорода (по массе или объему) для предварительного промывания-обеззараживания.

Способ также может включать добавление одного или нескольких веществ, регулирующих pH, таких как основания, кислоты и буферы (например, HCl, KOH, NaOH, и/или H₃PO₄, H₂SO₄, т. д.). 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. Значение pH может быть установлено пользователем на определенное значение или может быть предварительно запрограммировано для соответствующего изменения pH в течение всего процесса культивирования. Если регулирование pH должно выполняться вручную, в систему для ручного тестирования могут быть использованы известные в данной области техники инструменты для измерения pH.

Датчик температуры, такой как термометр или термопара, может использоваться для контроля температуры, а термометр может быть ручным или автоматическим. Автоматический термометр может управлять источниками тепла и охлаждения соответствующим образом, чтобы контролировать температуру в течение всего процесса культивирования.

В одном варианте осуществления способ включает дополнение культивирования источником 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, и аминокислоты. Указанные источники азота могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

Способ может дополнительно включать дополнение культивирования источником углерода. Источником углерода обычно является углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, манноза, маннит или мальтоза; органические кислоты, такие как уксусная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота и

пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, изопропил, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и льняное масло, т. д. Указанные источники углерода могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

В одном варианте осуществления факторы роста и микроэлементы для микроорганизмов включены в питательную среду. Неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и кобальт, также могут быть включены в питательную среду.

В одном варианте осуществления также могут быть включены неорганические 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.

Преимущественно способ 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.

В некоторых вариантах осуществления способ культивирования может дополнительно включать добавление дополнительных кислот и/или противомикробных препаратов в жидкую питательную среду перед и/или во время процесса культивирования. Противомикробные агенты или антибиотики используются для ингибирования или предотвращения загрязнения культуры. Кроме того, могут быть добавлены пеногасители для ингибирования или предотвращения образования и/или накопления пены, когда во время культивирования и ферментации образуется газ.

В одном варианте осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от примерно 5 до примерно 100 °С, предпочтительно от 15 до 60 °С, более предпочтительно от 25 до 50 °С. В дополнительном варианте осуществления культивирование может проводиться непрерывно при постоянной

температуре. В другом варианте культивирование может подвергаться изменению температуры.

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

В одном варианте осуществления значение рН смеси должно соответствовать интересующему микроорганизму. Буферные соли и регуляторы рН, такие как карбонаты и фосфаты, могут быть использованы для стабилизации рН около
10 оптимального значения. Когда ионы металлов присутствуют в высоких концентрациях, может потребоваться использование хелатирующего агента в жидкой питательной среде.

Микроорганизмы могут быть выращены в планктонной форме или в виде биопленки. В случае биопленки в емкости может быть субстрат, на котором можно
15 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
20 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.

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

Одним из продуктов на основе микроорганизмов по настоящему изобретению является инокулят, содержащий культуральную среду, содержащую микроорганизм
30 и/или побочные продукты жизнедеятельности, продуцируемые микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт способа культивирования 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 инокулюме могут находиться в активной или неактивной форме. Инокулюм может использоваться без дальнейшей стабилизации, консервации и хранения. Преимущественно, прямое использование этих инокулятов сохраняет высокую жизнеспособность микроорганизмов, уменьшает возможность загрязнения 5 посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Инокулят может быть удален из барабана и перенесен, например, через трубопровод для немедленного использования.

Преимущественно в соответствии с заявленным изобретением инокулят может 10 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.

15 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 20 настоящему изобретению также могут быть использованы для превращения субстрата, такого как руда, где трансформированный субстрат представляет собой продукт.

В настоящем изобретении дополнительно предложены продукты на основе микроорганизмов, а также применения для этих продуктов для достижения полезных результатов во многих условиях, включая, например, улучшенную биоремедиацию и 25 добычу полезных ископаемых, удаление и обработка отходов, улучшение здоровья скота и других животных, и содействие здоровью и продуктивности растений путем применения одного или нескольких продуктов на основе микроорганизмов.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ улучшения здоровья растений и/или повышения урожайности путем увеличения 30 объема продукта на основе микроорганизмов, раскрытого в настоящем документе, например, в системе ферментации на месте, и применения увеличенного в объеме продукта к почве, семенам или частям растений. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ увеличения урожайности

сельскохозяйственных культур или растений, включающему многократное применение увеличенного в объеме продукта.

5 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 композиция подходит для сельского хозяйства. Например, композиция может быть масштабирована и использована для обработки почвы, растений и семян. Композиция также может быть использована в качестве пестицида.

10 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
15 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.

ПРИМЕРЫ

20 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
25 модификации могут быть сделаны в отношении изобретения.

ПРИМЕР 1 — ПЕРЕМЕШИВАЮЩЕЕ УСТРОЙСТВО И УСТРОЙСТВО ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И РЕЖИМЫ РАБОТЫ

Было сконструировано переносное перемешивающее устройство с возможностью распределения, как показано на Фигуре 1. Устройство имеет
30 пластиковый вращающийся барабан, поддерживаемый каркасом с резиновыми колесами. От трех до четырех перегородок прикреплены по внутренней окружности барабана.

Вращение барабана приводилось в действие электродвигателем, подключенным к источнику питания, обеспечивая вращение барабана со скоростью 15-25 об/мин.

Барабан имел рабочий объем 100 литров для выращивания дрожжей *Starmerella* для получения клеток и метаболитов (однако размер и масштаб могут варьироваться в зависимости от требуемого применения). Устройство особенно хорошо подходит для глубинной культуры дрожжевых инокулятов клады *Starmerella*, которые подходят для инокуляции крупномасштабных систем ферментации на месте.

В целях дальнейшего снижения стоимости производства культуры и обеспечения масштабируемости технологии система не нуждается в стерилизации с использованием традиционных методов. Вместо этого можно использовать санирование пустой емкости, которое включает подачу потока пара под высоким давлением в течение 10 минут на внутренние поверхности барабана с последующей обработкой внутренних поверхностей в течение ночи 1-3 % перекисью водорода, предпочтительно 3 % перекисью водорода при вращении барабана. Кроме того, чтобы уменьшить вероятность загрязнения, вода, используемая для приготовления культуры, может быть отфильтрована через 0,1-микронный фильтр.

15 Состав питательных сред и культивирование дрожжевых культур

Культуральная среда, используемая для получения дрожжевого инокулята, содержала компоненты, указанные в Таблице 1.

Таблица 1. Компоненты для культуральной среды.

<u>Компонент</u>	<u>Вес (г/л)</u>
Дрожжевой экстракт	5
Глюкоза	20
Монофосфат калия	2
Гидрофосфат калия	2
Сульфат магния	0,5

20 Компоненты культуральной среды стерилизовали в 1 л 10 % перекиси водорода в течение ночи. Затем стерильную композицию смешивали с отфильтрованной водой в барабане смесителя.

Температура культивирования была обычно около комнатной температуры, от 18° до 25° Цельсия. Начальное значение pH среды составляло около 5,5-6,0.

25 В указанных условиях культивирования промышленно полезное получение биомассы, софоролипидов и других метаболитов достигается после от около 1 до около 5 дней культивирования, предпочтительно после времени культивирования около 48 часов.

По завершении культивирования конечная концентрация дрожжей составляет приблизительно от 200 до 400 КОЕ. Затем культуру можно использовать для инокуляции системы ферментации, в которой культура может быть увеличена в объеме для различных промышленных целей.

5 Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и содержание данной заявки.

10 Все патенты, патентные заявки, предварительные заявки и публикации, упомянутые или цитируемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме, включая все фигуры и таблицы, в той степени, в которой они не противоречат явным положениям настоящего описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования микроорганизмов, включающий:
предоставление устройства для ферментации, содержащего:
опорный каркас,
вращающийся барабан, установленный на опорном каркасе, и
двигатель, соединенный с барабаном, причем двигатель приводит барабан во вращение,
добавление микроорганизма в барабан устройства для ферментации, и
обеспечение работы устройства для ферментации, тем самым культивируя микроорганизм.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий добавление в барабан питательных веществ для микроорганизма.
3. Способ по п. 2, в котором питательные вещества включают источник углерода и источник азота.
4. Способ по любому из пп. 2-3, в котором питательные вещества дополнительно содержат белок, жир и фактор роста.
5. Способ по п. 4, в котором фактор роста включает витамин, регулятор pH или оба.
6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит множество перегородок на внутренней поверхности барабана.
7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором двигатель представляет собой электродвигатель или бензиновый двигатель.
8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит аккумулятор, к которому подключен двигатель.
9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором двигатель во время работы подключен к внешнему источнику питания.
10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит множество колес в нижней части каркаса.
11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит средство для регулировки угла наклона барабана.
12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства с барабаном,

расположенным таким образом, чтобы угол между его осью вращения и землей находился в диапазоне от 5° до 75°.

13. Способ по любому из пп. 1-11, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства с барабаном, расположенным таким образом, чтобы угол между его осью вращения и землей находился в диапазоне от 10° до 60°.

14. Способ по любому из пп. 6-13, в котором перегородки расположены так, что они параллельны оси вращения барабана.

15. Способ по любому из пп. 6-13, в котором перегородки расположены так, что они перпендикулярны оси вращения барабана.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение непрерывной работы устройства в течение периода времени, по меньшей мере, одного дня.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором барабан имеет форму цилиндра или модифицированного цилиндра.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором объем барабана находится в диапазоне от 10 до 1500 литров.

19. Способ по любому из пп. 1-17, в котором объем барабана находится в диапазоне от 50 до 500 литров.

20. Способ по любому из пп. 1-17, в котором объем барабана находится в диапазоне от 100 до 200 литров.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит датчик температуры для измерения температуры в барабане и датчик pH для измерения pH в барабане.

22. Способ по п. 21, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит регулятор температуры для регулирования температуры в барабане и регулятор pH для регулирования pH в барабане.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит датчик кислорода для измерения растворенного кислорода в барабане, датчик перемешивания для измерения перемешивания в барабане, датчик пенообразования для измерения пенообразования в барабане, датчик культуры микроорганизма для измерения чистоты культур микроорганизмов в барабане, датчик метаболитов для измерения продукции желаемых метаболитов в барабане или их комбинацию.

24. Способ по п. 23, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит: регулятор кислорода для регулирования растворенного кислорода в барабане, регулятор перемешиванием для регулирования перемешиванием в барабане, регулятор пенообразования для регулирования пенообразования в барабане, регулятор культуры микроорганизма для регулирования чистоты культур микроорганизмов в барабане, регулятор метаболитов для регулирования продукции желаемых метаболитов в барабане или их комбинацию.

25. Способ по любому из пп. 1-24, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит стерилизационный блок для стерилизации барабана *in situ*.

26. Способ по п. 25, в котором стерилизационный блок использует пар для стерилизации барабана.

27. Способ по любому из пп. 1-26, дополнительно включающий: стерилизацию барабана *in situ* перед добавлением микроорганизма в барабан.

28. Способ по п. 27, в котором стерилизация барабана включает использование: пара, отфильтрованного воздуха, высокой температуры, стерилизующего агента или их комбинаций.

29. Способ по п. 27, в котором стерилизация барабана включает промывание перекисью водорода в качестве стерилизующего агента.

30. Способ по любому из пп. 1-29, в котором микроорганизм продуцирует противомикробные метаболиты или побочные продукты, так что устройство для ферментации самостоятельно стерилизуется.

31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства при температуре в диапазоне от 25° С до 50° С.

32. Способ по любому из пп. 1-31, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства при рН в диапазоне от 2 до 10.

33. Способ по любому из пп. 1-31, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства при рН в диапазоне от 3 до 5.

34. Способ по любому из пп. 1-33, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает первое обеспечение работы устройства при первом рН в диапазоне от 4,0 до 4,5, а затем обеспечение работы устройства при втором рН в диапазоне от 3,2 до 3,5.

35. Способ по любому из пп. 1-34, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства с концентрацией растворенного кислорода в барабане выше 10 % насыщения.

36. Способ по любому из пп. 1-34, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства с концентрацией растворенного кислорода в барабане выше 25 % насыщения.

37. Способ по любому из пп. 1-36, дополнительно включающий добавление противомикробного вещества в барабан.

38. Способ по п. 37, в котором противомикробный агент представляет собой стрептомицин, окситетрациклин, софоролипид или рамнолипид.

39. Способ по любому из пп. 1-38, в котором микроорганизм представляет собой бактерию или гриб.

40. Способ по любому из пп. 1-39, в котором микроорганизм представляет собой бактерию, а бактерия представляет собой *Escherichia coli*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Azobacter*, *Arhrobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter*, *cyanobacteria*, *Pantoea*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Ralslonia*, *Rhodospirillum*, *Xanthomonas*, *Erwinia* или *Clostridium*.

41. Способ по любому из пп. 1-39, в котором микроорганизм представляет собой гриб, а гриб представляет собой *Starmerella*, *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus spp*, эндофитные грибы, *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Issalchenkia*, *Kluuveromyces* или *Pichia spp*.

42. Способ по любому из пп. 1-39, в котором микроорганизм представляет собой дрожжи, а дрожжи представляют собой штамм клады *Starmerella*.

43. Способ по любому из пп. 1-39, в котором микроорганизм представляет собой гриб *Mycorrhizal* или гриб *Starmerella*.

44. Способ по любому из пп. 1-39, в котором множество микроорганизмов добавляют в барабан, и каждый микроорганизм представляет собой бактерию или гриб.

45. Способ по п. 44, в котором микроорганизмы содержат *Escherichia coli*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Azobacter*, *Arhrobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter*, *cyanobacteria*, *Pantoea*,

Sphingomonas, Streptomyces, Streptovercillium, Ralslonia, Rhodospirillum, Xanthomonas, Erwinia, Clostridium или их комбинацию.

46. Способ по любому из пп. 44-45, в котором микроорганизмы содержат *Starmerella, Mycorrhiza, Mortierella, Phycomyces, Blakeslea, Thraustochytrium, Penicillium, Phythium, Entomophthora, Aureobasidium pullulans, Fusarium venenatum, Aspergillus, Trichoderma, Rhizopus spp*, эндофитные грибы, *Saccharomyces, Debaromyces, Issalchenkia, Kluyveromyces, Pichia spp.* или их комбинацию.

47. Способ по любому из пп. 44-46, в котором микроорганизмы содержат дрожжи штамма клады *Starmerella*.

48. Способ по любому из пп. 44-45, в котором микроорганизмы содержат гриб *Mycorrhizal*, гриб *Starmerella* или их комбинацию.

49. Способ по любому из пп. 1-48, в котором культивируемый микроорганизм представляет собой инокулянт, биопестицид, источник питательных веществ, агент ремедиации, продукт для здравоохранения, био-ПАВ или их комбинацию.

50. Способ по любому из пп. 1-48, в котором культивируемый микроорганизм представляет собой инокулят, подходящий для применения на месте.

51. Способ по п. 50, в котором инокулят пригоден для использования без дальнейшей стабилизации, консервации или хранения.

52. Способ по любому из пп. 1-51, в котором обеспечение работы устройства для ферментации включает обеспечение работы устройства при уровне влажности в диапазоне от 40 % до 60 %.

53. Способ по любому из пп. 1-51, в котором культивируемый микроорганизм содержит бульон, в котором был выращен указанный микроорганизм.

54. Композиция, содержащая микроорганизм, культивируемый способом по любому из пп. 1-53 и/или по меньшей мере один побочный продукт жизнедеятельности указанного микроорганизма.

55. Устройство для ферментации для культивирования микроорганизмов, включающее:

опорный каркас,

вращающийся барабан, установленный на опорном каркасе,

множество перегородок на внутренней поверхности барабана,

по меньшей мере, одно колесо, прикрепленное к нижней части опорного

каркаса, и

двигатель, соединенный с барабаном, причем двигатель приводит барабан во вращение.

56. Устройство по п. 55, в котором двигатель представляет собой электродвигатель или бензиновый двигатель.

57. Устройство по любому из пп. 55-56, дополнительно включающее аккумулятор, к которому подключен двигатель.

58. Устройство по любому из пп. 55-57, в котором двигатель выполнен с возможностью подключения к внешнему источнику питания во время работы.

59. Устройство по любому из пп. 55-58, включающее множество колес в нижней части каркаса.

60. Устройство по любому из пп. 55-59, дополнительно включающее средство для регулировки угла наклона барабана.

61. Устройство по любому из пп. 55-60, в котором устройство выполнено с возможностью работы с барабаном, расположенным таким образом, чтобы угол между его осью вращения и землей находился в диапазоне от 5° до 75° .

62. Устройство по любому из пп. 55-61, в котором перегородки расположены так, что они параллельны оси вращения барабана.

63. Устройство по любому из пп. 55-61, в котором перегородки расположены так, что они перпендикулярны оси вращения барабана.

64. Устройство по любому из пп. 55-63, в котором устройство выполнено с возможностью непрерывной работы в течение периода времени, по меньшей мере, одного дня.

65. Устройство по любому из пп. 55-64, в котором барабан имеет форму цилиндра или модифицированного цилиндра.

66. Устройство по любому из пп. 55-65, в котором объем барабана находится в диапазоне от 10 до 1500 литров.

67. Устройство по любому из пп. 55-65, в котором объем барабана находится в диапазоне от 50 до 500 литров.

68. Устройство по любому из пп. 55-65, в котором объем барабана находится в диапазоне от 100 до 200 литров.

69. Устройство по любому из пп. 55-68, дополнительно включающее датчик температуры для измерения температуры в барабане и датчик pH для измерения pH в барабане.

70. Устройство по п. 69, дополнительно включающее регулятор температуры для регулирования температуры в барабане и регулятор рН для регулирования рН в барабане.

71. Устройство по любому из пп. 55-70, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит датчик кислорода для измерения растворенного кислорода в барабане, датчик перемешивания для измерения перемешивания в барабане, датчик пенообразования для измерения пенообразования в барабане, датчик культуры микроорганизма для измерения чистоты культур микроорганизмов в барабане, датчик метаболитов для измерения продукции желаемых метаболитов в барабане или их комбинацию.

72. Устройство по п. 71, в котором устройство для ферментации дополнительно содержит: регулятор кислорода для регулирования растворенного кислорода в барабане, регулятор перемешиванием для регулирования перемешиванием в барабане, регулятор пенообразования для регулирования пенообразования в барабане, регулятор культуры микроорганизма для регулирования чистоты культур микроорганизмов в барабане, регулятор метаболитов для регулирования продукции желаемых метаболитов в барабане или их комбинацию.

73. Устройство по любому из пп. 55-72, дополнительно включающее стерилизационный блок для стерилизации барабана *in situ*.

74. Устройство по п. 73, в котором стерилизационный блок использует пар для стерилизации барабана.

75. Устройство по п. 73, в котором блок стерилизации использует: пар, отфильтрованный воздух, высокую температуру, стерилизующий агент или их комбинацию.

76. Устройство по любому из пп. 55-75, в котором устройство выполнено с возможностью принимать микроорганизм, который продуцирует противомикробные метаболиты или побочные продукты, так что устройство самостоятельно стерилизуется.

77. Устройство по любому из пп. 55-76, в котором устройство выполнено с возможностью работы при температуре в диапазоне от 25° С до 50° С.

78. Устройство по любому из пп. 55-77, в котором устройство выполнено с возможностью работы при рН в диапазоне от 2 до 10.

79. Устройство по любому из пп. 55-78, в котором устройство выполнено с возможностью принимать микроорганизм или множество микроорганизмов.

80. Устройство по п. 79, в котором микроорганизмы содержат *Escherichia coli*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Azobacter*, *Arhrobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter*, *cyanobacteria*, *Pantoea*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Ralslonia*, *Rhodospirillum*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Clostridium* или их комбинацию.

81. Устройство по любому из пп. 79-80, в котором микроорганизмы содержат *Starmerella*, *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus spp*, эндофитные грибы, *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Issalchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia spp*. или их комбинацию.

82. Устройство по любому из пп. 79-81, в котором микроорганизмы содержат дрожжи штамма клалды *Starmerella*.

83. Устройство по любому из пп. 79-80, в котором микроорганизмы содержат гриб *Mycorrhizal*, гриб *Starmerella* или их комбинацию.

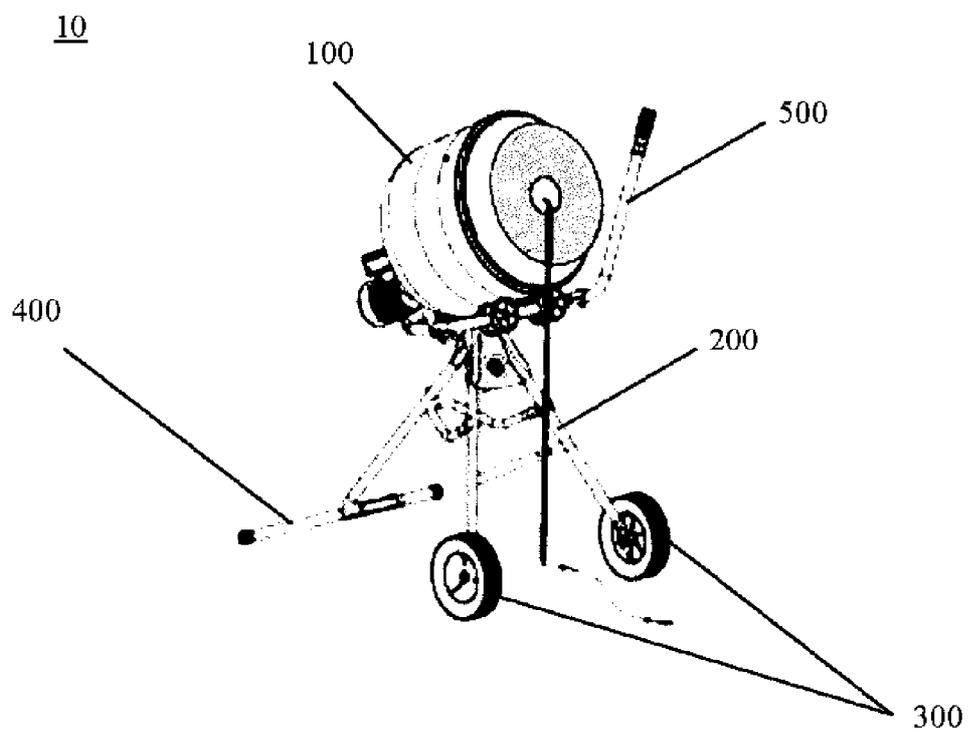
84. Устройство по любому из пп. 55-83, в котором устройство выполнено с возможностью культивирования микроорганизма, который представляет собой инокулят, подходящий для применения на месте.

85. Устройство по п. 84, в котором инокулят пригоден для использования без дальнейшей стабилизации, консервации или хранения.

86. Устройство по любому из пп. 55-85, в котором устройство выполнено с возможностью работы при уровне влажности в диапазоне от 40 % до 60 %.

ПЕРЕНОСНОЕ УСТРОЙСТВО И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ

1/1



ФИГ. 1