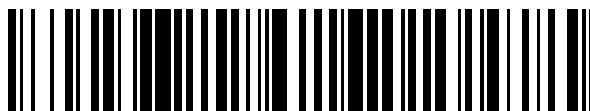


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 029**

51 Int. Cl.:

C12P 19/44 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2016 PCT/US2016/030721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16179249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2016 E 16789993 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3292210**

54 Título: **Un procedimiento semicontinuo para la preparación de ramnolípidos con alto rendimiento y título**

30 Prioridad:

05.05.2015 US 201562157101 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.11.2020

73 Titular/es:

**STEPAN COMPANY (100.0%)
22 West Frontage Road
Northfield, Illinois 60093, US**

72 Inventor/es:

LOHITHARN, NATTAPORN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 792 029 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento semicontinuo para la preparación de ramnolípidos con alto rendimiento y título

Campo técnico

5 Se proporciona un procedimiento semicontinuo de fermentación de un microorganismo productor de ramnolípidos, más precisamente *Pseudomonas aeruginosa*, para producir ramnolípidos. La fermentación puede realizarse como un procedimiento por lotes, pero al final de la fermentación se saca al menos aproximadamente el 70% del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos y se introduce el nuevo medio de cultivo (materia prima) como reemplazo.

Antecedentes

10 Los ramnolípidos (RL), un biotensoactivo de tipo glicolípido activo en la interfaz, que tiene las propiedades para reducir la tensión superficial entre dos líquidos diferentes, se usan ampliamente como emulsionantes, detergentes y agentes espumantes [1-3]. Se ha mostrado que los ramnolípidos pueden eliminar eficientemente el petróleo crudo del suelo contaminado y facilitan la biorremediación de los derrames de petróleo debido a sus propiedades de emulsificación que se denominan "recuperación mejorada de petróleo (EOR por sus siglas en inglés)" [4]. También se han utilizado
15 en la agricultura debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Los ramnolípidos están disponibles actualmente en un producto agrícola antifúngico comercializado como ZONIX y en un producto de limpieza industrial, RECO, para limpiar el aceite de los tanques de almacenamiento.

20 Se ha demostrado que el género *Pseudomonas* y *E. coli* son capaces de producir ramnolípidos (RL) a partir de una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno [5]. Aunque, el género *Pseudomonas* produce mayores rendimientos y títulos de RL que *E. coli* [5, 6], la concentración de RL no es lo suficientemente alta como para que el procedimiento de fermentación sea comercialmente viable. Se han llevado a cabo una serie de estrategias para aumentar la productividad de RL, que incluyen diferentes fuentes de carbono, cepas genéticamente modificadas y una estrategia de fermentación que parece ser la ruta más efectiva de lograr.

25 La fermentación discontinua y por lotes alimentados es el procedimiento de fermentación más común con *Pseudomonas* [7 - 11]. La fermentación discontinua es el procedimiento de cultivo más simple [7,8] en el que se agrega materia prima (fuente de carbono) en el fermentador al principio con el inóculo. La fermentación se lleva a cabo hasta que los microorganismos utilizan toda la materia prima, luego se apaga el fermentador y se inicia el nuevo lote [9]. El lote alimentado, por otro lado, es la fermentación discontinua, pero con la adición de materia prima (fuente de carbono), después de que la materia prima se utiliza por completo, durante el transcurso de la fermentación [9-11]. El mejor título
30 RL actualizado reportado (productividad) es de aproximadamente 0.58-0.72 g/L/h obtenido de la fermentación por lotes alimentados de *P. aeruginosa* [10]. Sin embargo, este procedimiento requiere el apagado del fermentador después de 90-120 horas antes de comenzar un nuevo lote alimentado. De modo similar, la patente estadounidense número 5,658,973 informó 78 g/L de ramnolípidos producidos después de 167 horas [8], lo cual es demasiado tiempo para operar.

35 Tabla 1: Resumen de diversos procedimientos de fermentación de rhamnolípido (RL) por *P. aeruginosa*

Tipo de fermentación	RL (g/L)	Tiempo de fermentación (h)	Título de RL (g/L/h)	Referencia
Batch	70	144	0.49	[7]
Lote	78	167	0.47	[8]
Lote alimentado	65	90	0.72	[10]
Lote alimentado	70	120	0.58	[10]
Lote alimentado	4.1	72	0.06	[11]
Estado sólido	46	288	0.16	[12]

40 La publicación EP0282942 divulga la producción de ramnosa mediante fermentación semicontinua usando la cepa 29791 de *Pseudomonas aeruginosa*. Después de un período de incubación de 4 días, se retiraron 1.5 litros (un cuarto del volumen de trabajo) del medio de cultivo y se reemplazaron con medio fresco después de 47 h y 75 h para obtener unas tasas de productividad de alrededor de 10 g de rhamnolípido/l-día.

La publicación US4628030 divulga un procedimiento para preparar rhamnolípido con un suministro continuo de medio de cultivo fresco y retiro continuo de una solución de medio de cultivo parcialmente gastado y tensioactivos preparados, a una tasa de dilución por debajo de 0.3 h⁻¹ y limitando la cantidad de al menos dos sustancias esenciales de

crecimiento s seleccionadas del grupo que consiste en carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, zinc, manganeso, boro, cobalto, cobre y molibdeno, en el medio de cultivo de modo que la cantidad de sustancia esencial de crecimiento en el cultivo parcialmente gastado sea menos de la mitad de la cantidad en el medio de cultivo fresco.

5 Resumen

Aquí se proporciona un procedimiento semicontinuo de fermentación para preparar una pluralidad de fermentaciones que comprenden uno o más ramnolípidos que comprende

10 (a) Cultivar un microorganismo productor de ramnolípidos en medio de cultivo que comprende al menos una fuente de nitrógeno, al menos una fuente de fósforo, al menos una fuente de magnesio, al menos una fuente de potasio, al menos una fuente de azufre, al menos una fuente de cloro y al menos una fuente de sodio entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 días para obtener un primer medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos;

(b) Eliminar al menos aproximadamente 70% y más particularmente entre aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, o alternativamente entre aproximadamente 70 a aproximadamente 90% del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos obtenidos en (a);

15 (c) Reemplazar dicho medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos eliminados en (b) con medio de cultivo que tiene la composición establecida en la etapa (a);

(d) Repetir los pasos (a) - (c) al menos una vez para obtener una fermentación posterior que comprende ramnolípidos;

En donde se producen al menos 45 g/L.

20 En donde dichos pasos (a) - (c) pueden repetirse durante al menos aproximadamente 30 días y en donde dicho microorganismo que produce rhamnolípidos es *Pseudomonas aeruginosa*.

25 En una forma particular de realización, *P. aeruginosa* puede cultivarse a una temperatura de aproximadamente 25-40°C y más particularmente a una temperatura de aproximadamente 30-37°C y/o a un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9 y más particularmente a un pH de alrededor de 6-8.6. El pH al comienzo de la fermentación después de reemplazar el nuevo medio de cultivo en la etapa (c) puede ser, en una forma particular de realización, de alrededor de 6-7, preferiblemente 6.2-6.5. No es necesario controlar el pH de la fermentación en el transcurso de la fermentación.

30 En otra forma particular de realización, dicho procedimiento comprende además añadir una composición que comprende uno o más micronutrientes. En una forma particular de realización, dicho micronutriente está presente en no más de aproximadamente 20 mg/L. En una forma particular de realización, dicho micronutriente está presente entre aproximadamente 1 mg/L y aproximadamente 14 mg/L. Dicha composición puede añadirse diariamente o continuamente a 0.1 % v/v del volumen total de fermentación por día.

El procedimiento expuesto anteriormente puede comprender además añadir un agente antiespumante. Dicho agente antiespumante puede ser un agente antiespumante a base de carbono o silicio.

35 El procedimiento expuesto anteriormente permite que la fermentación se ejecute como un procedimiento por lotes, pero al final de la fermentación, se extrae al menos aproximadamente el 70% del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos y el nuevo medio de cultivo (materia prima) se alimenta como un reemplazo. Este procedimiento (etapa (d)) puede repetirse durante al menos aproximadamente un mes y, en otra forma de realización, hasta aproximadamente 180 días sin tener que sacrificar el rendimiento y el título de RL. Permite que el fermentador se utilice a una mayor capacidad con menos tiempo de inactividad para la limpieza en comparación con las estrategias de fermentación por lote alimentado. Como se señaló anteriormente, dicho paso del procedimiento (d) se repite al menos una vez. En una forma particular de realización, dicho paso del procedimiento (d) se repite al menos 5 veces.

45 En una forma particular de realización, dicho procedimiento produce concentraciones de ramnolípidos de al menos aproximadamente 45 g/L y más particularmente de alrededor de 60-80 g/L con una productividad de ramnolípidos (título) tan alta como aproximadamente 1.6 g/L/h. En una forma particular de realización, donde la fuente de carbono es un aceite, solo se detecta una composición de aceite residual de no más de aproximadamente 0.8% p/v en la etapa (b).

Definiciones

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo declarado está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o en las pruebas de la presente invención también se puede usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos aquí, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos.

- 5 Debe mencionarse que tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de "uno(a)", "y" y "el (la)" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 10 A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas aquí. Se pretende que dichos equivalentes sean abarcados por la presente invención. A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o un paso o un grupo establecido de enteros o pasos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos. Por lo tanto, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", "que tiene", etc. se leerán de manera expansiva o abierta y sin limitación. Cuando se usa en el presente documento, el término "que comprende" puede sustituirse por el término "que contiene" o, a veces, cuando se usa en el presente documento, por el término "que tiene".

- 15 Como se define en el presente documento, un "ramnolípido" se refiere a un glicolípido que tiene una porción lipídica que incluye uno o más residuos de ácido β -hidroxicarboxílico típicamente lineales, saturados o insaturados y una porción de sacárido de una o más unidades de ramnosa.

- 20 La porción de sacárido y la porción de lípidos están unidas mediante un enlace β -glicosídico entre el grupo 1-OH de un residuo ramnosa de la porción de sacárido y el grupo 3-OH de un ácido β -hidroxicarboxílico de la porción lipídica. Así, el grupo carboxílico de un residuo de ácido carboxílico define el extremo del ramnolípido. Cuando se incluye más de un residuo ramnosa en un ramnolípido, cada uno de los residuos ramnosa no unidos a la porción lipídica se une a otro residuo ramnosa a través de un enlace 1,4 β -glicosídico. En formas de realización donde están presentes dos o más ácidos β -hidroxicarboxílicos en un ramnolípido, los residuos de ácido β -hidroxicarboxílico se seleccionan independientemente uno del otro. Los residuos de ácido β -hidroxicarboxílico de una pluralidad respectiva de residuos de ácido β -hidroxicarboxílico pueden ser idénticas en algunas formas de realización. En algunas formas de realización son diferentes entre sí.

- 25 Como se define aquí, una "composición de micronutrientes" es una composición que comprende un micronutriente presente en una cantidad no mayor de aproximadamente 20 mg/L.

Los términos "medio de cultivo", "medio de fermentación" son sinónimos y se usan indistintamente.

Breve descripción de las figuras

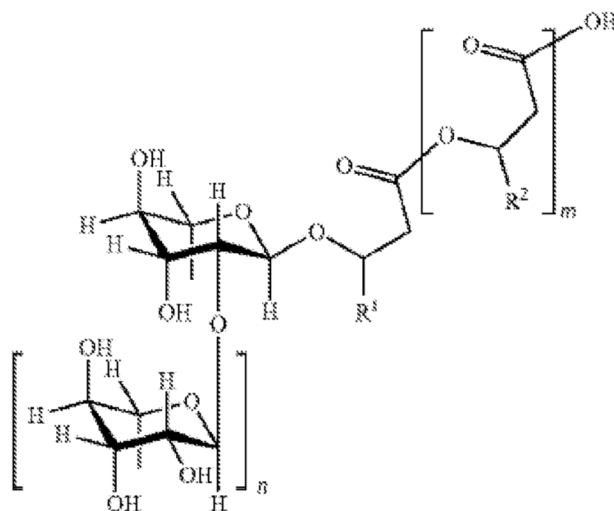
- 30 La Figura 1 es una representación esquemática del procedimiento semicontinuo de fermentación para producir ramnolípidos.

La Figura 2 muestra el cambio en el pH durante el curso de la fermentación con los pasos (a) - (c) que se repiten durante más de 30 días en el Ejemplo 4.

La Figura 3 muestra el cambio en el pH en el transcurso de la fermentación después de la inoculación posterior o después de llenar con el nuevo medio de cultivo en el Ejemplo 5.

- 35 Descripción detallada

En este documento se proporciona un procedimiento semicontinuo de fermentación para producir una pluralidad de fermentaciones que comprenden uno o más ramnolípidos. En un aspecto particular, el ramnolípido puede tener la estructura (I).



5 en la cual $m = 2, 1$ o 0 , en particular 1 o 0 , $n = 1$ o 0 , o en particular 1 , R^1 y $R^2 =$ independientemente uno del otro un radical orgánico idéntico o diferente con 2 a 24 ; preferiblemente un radical alquilo de 5 a 13 átomos de carbono, en particular opcionalmente ramificado, opcionalmente sustituido, en particular sustituido con hidroxilo, opcionalmente insaturado, en particular opcionalmente mono-, di- o triinsaturado; preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en pentenilo, heptenilo, nonenilo, undecenilo y tridecenilo y $(CH_2)_o-CH_3$ donde $o = 1$ a 23 , preferiblemente 4 a 12 .

10 Tanto la cadena principal como las ramas pueden contener además heteroátomos como, por ejemplo, N, O, S, Se o Si o un átomo de carbono puede reemplazarse por uno de estos heteroátomos. Un residuo alifático puede estar sustituido o no sustituido con uno o más grupos funcionales. Los sustituyentes pueden ser cualquier grupo funcional como, por ejemplo, pero sin limitación, amino, amido, carbonilo, carboxilo, hidroxilo, nitro, tio y sulfonilo.

Microorganismo Productor de Ramnolípidos

15 Como se señaló anteriormente, el procedimiento comprende cultivar un microorganismo productor de ramnolípidos, más precisamente *P. aeruginosa*. Un microorganismo productor de ramnolípidos puede ser una célula anfitriona que produce ramnolípidos. Una célula anfitriona recombinante que produce ramnolípidos puede ser una célula anfitriona, tal como una célula bacteriana que expresa un gen *RhIA* u ortólogo del mismo y/o un gen *RhIB* u ortólogo del mismo, y/o un gen *RhIC* u ortólogo del mismo, y/o un gen *RhIR* u ortólogo del mismo, y/o un gen *RhII* u ortólogo del mismo, y/o un gen *RhIG* u ortólogo del mismo y otros.

20 Alternativamente, un "microorganismo productor de ramnolípidos" puede ser cualquier microorganismo, como las bacterias, que tiene la capacidad de sintetizar/producir ramnolípidos en condiciones adecuadas que incluyen, pero no se limitan a, la bacteria de los filos actinobacterias, fomicutes y proteobacterias. En una forma particular de realización, el microorganismo que produce ramnolípidos es una bacteria de la clase Gammaproteobacteria. En otra forma de realización, el microorganismo productor de ramnolípidos es una bacteria del orden Pseudomonadales. En otra forma de realización más, el microorganismo productor de ramnolípidos es una bacteria de la familia Pseudomonadaceae. En 25 incluso una forma más de realización, el microorganismo productor de ramnolípidos es una bacteria del género *Pseudomonas*, como *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. clemancea*, *P. collierea*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. putida*, *P. stutzeri* y *P. teessidea*. En una forma de realización adicional, el microorganismo productor de ramnolípidos es *P. aeruginosa*.

Medio de cultivo

30 El microorganismo que contiene ramnolípidos se cultiva en medio de cultivo. Dicho medio de cultivo comprende al menos una fuente de carbono, al menos una fuente de nitrógeno, al menos una fuente de fósforo, al menos una fuente de azufre, al menos una fuente de sodio, al menos una fuente de magnesio, al menos una fuente de potasio, al menos una fuente de azufre y al menos una fuente de cloruro.

35 La fuente de carbono puede ser un monosacárido, por ejemplo, glucosa; un disacárido, por ejemplo, sacarosa; un alcohol de azúcar, por ejemplo, glicerol; un alcano de cadena larga, por ejemplo, n-hexadecano; un ácido graso como el ácido caprílico (también denominado ácido octanoico), aceites vegetales (frescos o de desecho; por ejemplo, aceite de soja) o mezclas de los mismos; ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido propiónico), alcoholes (p. ej. etanol), y mezclas de estos. En una forma particular de realización, la fuente de carbono es un aceite vegetal seleccionado del grupo que consiste en aceite de oliva, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de canola y aceite de soja. La fuente de carbono puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 6% a aproximadamente 12% p/p.

La fuente de nitrógeno puede ser sulfato de amonio, fosfato de amonio, urea, extracto de levadura, extracto de carne, peptona y licor de maíz. En una forma particular de realización, la fuente de nitrógeno es NaNO_3 . En otra forma de realización más, el nitrógeno puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1-10 g/L.

5 En una forma particular de realización, la fuente de fósforo puede ser H_3PO_4 o K_2HPO_4 . En otra forma particular de realización más, dicho fósforo está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a 10 g/L.

En una forma particular de realización, el ion magnesio puede ser $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y/o MgCl_2 . En una forma particular de realización, el magnesio está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01-1 g/L.

El potasio puede ser KCl y/o KOH. En una forma particular de realización, el potasio está presente en una cantidad de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 g/l.

10 El sodio puede ser NaCl, NaNO_3 y NaOH. En una forma particular de realización, dicho ión de sodio está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a 15 g/L.

El cloruro puede ser KCl y NaCl. En una forma particular de realización, dicho ion de cloruro está presente en una cantidad de aproximadamente 0.1-1 g/L.

15 El azufre puede ser H_2SO_4 . En una forma particular de realización, dicho ion de azufre está presente en una cantidad de aproximadamente 0.1-1 g/L.

20 Las fuentes de azufre, cloruro y nitrógeno pueden derivarse de la capa acuosa, o también pueden referirse como la fase líquida acuosa o la fase acuosa de un medio de fermentación que contiene microorganismos tratados con ácido y envejecidos. En una forma de realización específica, el medio de fermentación o cultivo que comprende uno o más ramnolípidos se puede envejecer incubando durante al menos aproximadamente 1 día y entre aproximadamente 24-72 horas entre aproximadamente 0-30°C. En una forma particular de realización, el medio acuoso envejecido puede tratarse con ácido, de modo que el medio de cultivo se ajusta a un pH de aproximadamente 1.5 a 2.5, preferiblemente, de aproximadamente 2.05 a aproximadamente 2.15. El ácido puede ser un ácido orgánico como el ácido acético o un ácido mineral. En una forma de realización preferida, el ácido es un ácido mineral, por ejemplo, HCl, H_2SO_4 , HNO_3 o H_3ClO_4 . Como resultado, se genera una fase líquida acuosa, una fase oleosa y una fase sólida. La fase líquida acuosa se elimina usando procedimientos conocidos en la técnica y en una forma de realización específica usando procedimientos expuestos anteriormente (por ejemplo, filtración, o centrifugación o sedimentación combinada con decantación).

30 El medio de cultivo puede comprender además un emulsionante. En una forma particular de realización, el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en goma arábica, goma guar y ramnolípidos. En otra forma más particular de realización, la relación de emulsionante a fuente de carbono en dicho medio de cultivo está entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 20% p/p. En aún otra forma particular de realización, dicho emulsionante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5-10% en peso.

35 En una forma particular de realización, el medio de cultivo o fermentación se esteriliza usando procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos pueden estar basados en la filtración, el calor, la química o la radiación ultravioleta. En una forma particular de realización, el tratamiento basado en calor puede ser a través de esterilización por calor húmedo, particularmente autoclave.

40 En una forma de realización, el medio acuoso (por ejemplo, medio de fermentación) puede esterilizarse mediante uno de los procedimientos anteriores. En otra forma de realización, los medios de fermentación pueden esterilizarse mediante más de uno de los procedimientos expuestos anteriormente y estas esterilizaciones podrían ser en cualquier orden. Puede esterilizarse en la fermentación durante el primer ciclo de fermentación, pero debe esterilizarse en otro recipiente en ciclos posteriores.

Composición de micronutrientes

45 Como se indicó anteriormente, dicho procedimiento puede comprender además la adición de una solución o composición de micronutrientes. Dicho micronutriente puede ser un rastro de Fe, Mn, Zn, Cu, Na. En una forma particular de realización, dicho micronutriente es una sal de Fe, Mn, Zn, Na o Cu. En una forma de realización más particular, dicha composición de micronutrientes comprende sales de Fe, Mn, Zn, Na y Cu. La composición puede esterilizarse por filtración.

50 En formas de realización particulares, dicha sal de Cu es al menos una de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,5-3 g/L de solución de micronutrientes; dicha sal de Mn es al menos una de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.1-1,5 g/L de solución de micronutrientes; dicha sal de Zn es $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o ZnCl_2 y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.5-3 g/L de solución de micronutrientes; dicha sal de Fe es al menos una de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o FeSO_4 y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.1-1 g/L de solución de micronutrientes; dicha sal de sodio es $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1-5 g/L de solución de micronutrientes.

55

Descripción de formas de realización específicas

Ejemplo 1: preparación del medio de cultivo

En la Tabla 2, más adelante, se muestra una composición del 8% de aceite de soja en el medio de cultivo para la fermentación de *Pseudomonas aeruginosa* para la preparación de ramnolípidos. La goma arábica se usa al 10% p/p de aceite de soja.

5

Tabla 2: Composición del medio de cultivo

Componente	Concentración	
Goma arábica	8.00	g/L
Aceite de soja	80.00	g/L
85% H_3PO_4	9.69	g/L
99% $NaOH$	5.21	g/L
99% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	g/L
99% KCl	1.00	g/L
99% $NaNO_3$	15.00	g/L
98% H_2SO_4	0.92	g/L
Agua desionizada	El resto	

Para preparar el medio de cultivo, la goma arábica se disuelve primero en agua desionizada para obtener una solución de goma arábica al 5% p/p con agitación a 150-250 rpm y a 40-45 °C en un recipiente separado. Este paso durará al menos 30 minutos para permitir que toda la goma arábica se disuelva en agua. En segundo lugar, mezclar el aceite de soja y la solución de goma arábica al 5% con agua desionizada usando una batidora como una batidora de cocina. Asegurarse de que esté bien mezclado para obtener una emulsión (es decir que la solución se vuelve blanca como la leche). Después de obtener la emulsión de aceite de soja, se agrega H_3PO_4 a la emulsión con agitación y se agrega la siguiente sustancia química $NaOH$ después de que H_3PO_4 se haya disuelto bien. Las siguientes sustancias químicas, que son $MgSO_4$, luego KCl y luego $NaNO_3$ y por último H_2SO_4 se agregan a la emulsión con agitación. Antes de agregar la siguiente sustancia química, asegurarse de que se disuelva bien en la emulsión. El medio de cultivo se puede esterilizar luego en flujo (autoclave).

10

15

Ejemplo 2: preparación de la composición de micronutrientes

La composición de micronutrientes se muestra en la Tabla 3. Tenga en cuenta que la concentración de cada sal está en g/L de solución de micronutrientes.

20

Tabla 3: Composición de micronutrientes

Componente	Concentración	
$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	2.0	g/L
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.3	g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.4	g/L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	1.2	g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.2	g/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.8	g/L

Todos los productos químicos son de grado ACS (la más alta pureza disponible). $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ se agrega primero a agua desionizada usando agitación. Después de que se haya disuelto todo, se puede agregar la siguiente sustancia química que es $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Este paso se repite hasta que todos los productos químicos enumerados en la tabla se agreguen a la solución en el orden de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ luego $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ luego $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, luego $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y $MnSO_4 \cdot H_2O$ al final. El micronutriente se puede esterilizar usando una filtración esterilizada de 0.2 micras. No vaporizar en autoclave el micronutriente.

25

Ejemplo 3: Cultivo de semillas de *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula (cepa R4)

La cepa R4 obtenida de ATCC # 55734 se inocula primero en placas de agar que contienen 40 g/l de agar de soja triptico a 32°C durante 18-24 horas. Después de que se forman las colonias R4, se cultiva una sola colonia en 5 ml de caldo LB 20 g/L (Lennox) en un tubo de agitación a 37°C durante 20-24 horas. El OD₆₀₀ final es de aproximadamente 3-5 y la solución de caldo LB (Lennox) en el tubo de batido cambiará de amarillo a verde. Luego, el cultivo R4 obtenido de un tubo de agitación se inocula en un matraz de agitación que contiene 20 g/L de Caldo LB (Lennox) con una inoculación al 1% y se incuba a 37 °C durante 20-24 horas. Este procedimiento se repite según sea necesario para generar suficiente inóculo de R4 requerido para la fermentación. El caldo LB (Lennox) se obtiene de Sigma Aldrich # 3022 que contiene 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl.

Ejemplo 4: fermentación semicontinua de ramnolípidos con agua desionizada y goma arábica al 10% p/p (como emulsionante) a aceite de soja

La fermentación de *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula obtenida de ATCC # 55734 (R4) se realiza en un biorreactor de 10 L y se expone esquemáticamente en la Figura 1. Se inicia con la preparación de 8 L del medio de cultivo de 8% de aceite de soja y 10% p/p de goma arábica a aceite de soja en el fermentador 10. Los productos químicos utilizados en el medio de cultivo en el Ejemplo 1 son grados ACS (la pureza más alta disponible). Después de la esterilización del medio de cultivo, la temperatura se enfría a 37°C usando una camisa de calentamiento de agua y comienza la agitación (250 rpm). Una vez que la temperatura es estable a 37 °C, se suministra aire filtrado de 0.2 micras al fermentador a través de la línea de aireación (# 4) a 1.5 L/min y el fermentador se inocula con un inóculo de R4 al 2,5% (200 ml) obtenido del Ejemplo 3 a través de la línea # 1. 8 ml del micronutriente esterilizado por filtración, preparado en el Ejemplo 2, se agrega luego al fermentador a través de la línea # 2 una vez al día. En el caso de que el micronutriente no se pueda agregar diariamente, se diluyen 8 ml de micronutriente en 32 ml de agua desionizada (por día) para agregarse continuamente en el fermentador a 40 ml/día usando una bomba peristáltica. El antiespumante a base de silicio (Sigma Aldrich # 85390) se agrega automáticamente para liquidar la espuma durante la fermentación a través de la línea # 3.

La fermentación se realiza a una temperatura de 37 °C con un pH inicial del medio de cultivo de 6.2 sin control de pH durante la fermentación. La velocidad de agitación aumenta automáticamente según sea necesario para mantener el % de oxígeno disuelto (% OD) en 15% - 20%. La velocidad de agitación aumenta a 500 rpm antes de que la velocidad del flujo de aire aumente de 1.5 a 3.5 L/min a las 40-48 horas después de la inoculación para mantenerse al día con la demanda de oxígeno de los microbios durante la velocidad de crecimiento. Después de 60 horas de la inoculación, el pH aumenta después de que baja ligeramente (o permanece estable). Además, el % de OD aumenta mientras que la agitación y el flujo de aire están en los valores más bajos (250 rpm y 1,5 L/min, respectivamente), lo que indica que la fermentación se completa a las 72 horas. Esto puede confirmarse con un aceite de soja residual en medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos para que sea inferior al 0,8%.

La bomba peristáltica se inicia luego para eliminar 6 L (75% del total) del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos a través de la línea # 5. Una vez que se eliminan 6 L de caldo, lo que se denomina "Saque # 1", los 6 L recién esterilizados de medio de cultivo de aceite de soja al 8% preparado en el tanque esterilizado 20 se alimentan al fermentador 10 usando una alimentación por gravedad. El pH inicial de fermentación es 6.5. Se utilizan los parámetros de fermentación descritos en el párrafo anterior. En este caso, después de 48 horas, se completa la fermentación y el 75% del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos está listo para sacarse (Saque # 2). Posteriormente, el siguiente lote de medio de cultivo de aceite de soja esterilizado se alimenta desde el tanque esterilizado 20. El procedimiento se repite durante 6 semanas sin signos de pérdida en los rendimientos y títulos de los rhamnolípidos antes de que el fermentador se cierre para su limpieza. En la Figura 2 se muestra un cambio en el pH en el transcurso de la fermentación entre el saque y para cada saque. La concentración y el título de ramnolípidos (RL) se muestran en la Tabla 4 más adelante. La concentración de ramnolípidos (RL) de todos los 12 saques es de al menos 62 g/L hasta 79 g/L. La productividad (título) de RL es de 0.92-1.61 g/L/h.

Tabla 4: Concentración y título de ramnolípidos durante la fermentación semicontinua con aceite de soja

# de saque	% Inicial de aceite de soja	Tiempo de fermentación (entre saques) (h)	RL total (g/L)	Título de RL (g/L/h)	Micronutriente
1	8.0%	72	66	0.92	
2	6.0%	48	62	1.29	Agregado continuamente
3	6.0%	46	71	1.54	
4	7.5%	69	77	1.12	
5	6.0%	46	74	1.61	
6	6.0%	48	74	1.54	

ES 2 792 029 T3

7	7.5%	71	79	1.11	Agregado diariamente
8	6.0%	47	70	1.49	
9	6.0%	46	66	1.43	
10	7.5%	69	65	0.94	
11	6.0%	48	68	1.42	Agregado continuamente
12	6.0%	48	69	1.44	

Ejemplo 5: fermentación semicontinua de ramnolípidos con agua desionizada, 5% p/p de goma arábica a aceite de soja con micronutrientes añadidos continuamente

5 La composición del medio de cultivo utilizado en la Tabla 5. 7.3 L de 8% de aceite de soja con 5% p/p de goma arábica a aceite de soja se prepara como se describe en el Ejemplo 1. Todos los productos químicos utilizados en este ejemplo son impurezas que contienen grado industrial.

Tabla 5: Composición del medio de cultivo con 5% de goma arábica, 8% de aceite de soja y 5% de inóculo R4

Componente	Concentración	
Goma arábica	4.00	g/L
Aceite de soja	80.00	g/L
85% H_3PO_4	9.69	g/L
99%NaOH	5.21	g/L
99%MgSO ₄ *7H ₂ O	0.50	g/L
99%KCl	1.00	g/L
99%NaNO ₃	15.00	g/L
98%H ₂ SO ₄	0.92	g/L
Agua desionizada	El resto	

10 La fermentación se realiza como en el Ejemplo 4, excepto que se usa 5% (360 ml) de inóculo R4 para inocular el fermentador y se extrae 77% del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos (5.6 L) y el nuevo medio de cultivo contiene 5 % p/p de goma arábica a aceite de soja. El micronutriente se prepara como se describe en el Ejemplo 2. Al diluir 7,3 ml de micronutrientes en 32.7 ml de agua desionizada (por día), se agrega continuamente al caudal de 40 ml/día usando una bomba peristáltica. El antiespumante a base de silicio (DOW AFE-1510) se agrega automáticamente para tumbar la espuma durante la fermentación. La velocidad de agitación aumenta automáticamente según sea necesario para mantener el % de oxígeno disuelto (% OD) al 15% -20% con una velocidad de flujo de aire de 1.5 L/min. El oxígeno puro se agrega adicionalmente al fermentador a 0.005 - 0.1 L/min para mantener la agitación baja y, por lo tanto, un menor problema de espuma. En la Figura 3 se muestra un cambio típico en el pH en el transcurso de la fermentación posterior a la inoculación o después del llenado con el nuevo medio de cultivo. La concentración y el título de ramnolípido (RL) se muestran en la Tabla 6 a continuación.

20 Tabla 6: Concentración y título de ramnolípidos usando un procedimiento semi-continuo usando un inóculo de R4 al 5%

# de saque	% Inicial de aceite de soja	Tiempo de fermentación (entre saque) (h)	RL total (g/L)	Título de RL (g/L/h)
1	8.0%	59	56	0.90
2	7.7%	70	79	1.13
3	6.1%	65	76	1.17

4	8.0%	96	70	0.73
5	7.7%	91	76	0.84
6	8.0%	82	70	0.85
7	7.7%	70	78	1.11

Ejemplo 6: fermentación semicontinua de ramnolípidos con agua desionizada, 5% p/p de goma arábica a aceite de soja con 2x de micronutrientes añadidos continuamente

5 En este ejemplo, el medio de cultivo y los parámetros de fermentación son los mismos que se muestran en el Ejemplo 5, excepto que la cantidad de micronutrientes utilizada es el doble. Al diluir 14,6 ml de micronutrientes (preparados en el Ejemplo 2) en 26,4 ml de agua desionizada (por día), se agrega continuamente a un caudal de 40 ml/día usando una bomba peristáltica. La velocidad de agitación aumenta automáticamente según sea necesario para mantener el % de oxígeno disuelto (% OD) al 15% -20% con una velocidad de flujo de aire de 1.5 L/min. Además, se agrega oxígeno puro al fermentador al 10-30% del flujo de aire para mantener constante el caudal total a 1.5 L/min para mantener baja la agitación y, por lo tanto, menos problemas de espuma. La concentración y el título de ramnolípidos (RL) se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Concentración y título de RL durante la fermentación semicontinua con 2X micronutrientes

# de saque	% Inicial de aceite de soja	Tiempo de fermentación (entre saque) (h)	RL total (g/L)	Título de RL (g/L/h)
1	7.7%	73	75	1.03
2	6.1%	48	64	1.33
3	7.7%	68	69	1.01
4	6.1%	69	66	0.96

15 Ejemplo 7: fermentación semicontinua de ramnolípidos con 8% de aceite de soja y 85% de agua corriente fría / 15% de corriente de residuos de la capa superior acuosa del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos

La composición del medio de cultivo utilizado en este Ejemplo se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Medio de cultivo con capa acuosa

Componente	Concentración
Aceite de soja	80.00 g/L
85% H_3PO_4	9.69 g/L
99%NaOH	5.21 g/L
99%MgSO ₄ *7H ₂ O	0.50 g/L
99%KCl	1.00 g/L
99%NaNO ₃	15.00 g/L
Agua residual de capa acuosa	150.00 g/L
Agua corriente fría	El resto

20 La corriente residual de la capa superior acuosa puede obtenerse usando los procedimientos descritos en la solicitud de EE.UU. No. de serie 14992995, presentada en enero 11, 2016 (véase Ejemplo 3 de dicha solicitud). Brevemente, la corriente acuosa residual de la capa superior se obtiene del caldo de fermentación clarificado. El caldo clarificado se prepara permitiendo que el medio de fermentación que contiene P. aeruginosa, que termina a un pH de 6.0 a 6.5, envejezca en condiciones ambientales durante aproximadamente 2 días. La biomasa se asienta en el fondo del recipiente utilizado para este procedimiento de envejecimiento y, después de su eliminación, el sobrenadante

25

transparente es caldo clarificado. El siguiente paso en el procedimiento es agregar ácido, como ácido sulfúrico concentrado, hasta que el pH sea aproximadamente 2.1. Los ramnolípidos se precipitan de la solución y forman una fase sólida y una fase líquida oleosa en el fondo del recipiente utilizado para este paso. La separación de las fases líquida sólida y aceitosa se puede acelerar mediante centrifugación. Las fases sólida y líquida oleosa se separan de la fase o capa superior acuosa, que se puede desechar o reciclar. La capa acuosa mencionada anteriormente es una fuente de H₂SO₄ y micronutrientes de los cuales el 15% p/p se usa en el medio de cultivo con 8% de aceite de soja en el balance del agua corriente fría. La capa superior acuosa de la corriente residual se filtra primero a 1 micra para eliminar partículas grandes antes de su uso.

7.3 L del medio de cultivo que contiene 8% de aceite de soja con 15% de capa superior acuosa de flujo residual y agua corriente fría se preparan mezclando primero aceite de soja, la capa superior acuosa y el agua corriente fría usando una batidora de cocina. Después de que todos estén bien mezclados, se agregan H₃PO₄, NaOH, MgSO₄, KCl y NaNO₃ a la solución en ese orden, con agitación. El medio de cultivo se puede esterilizar en corriente (autoclave). Todos los productos químicos utilizados en este ejemplo son de grado industrial que contiene impurezas.

La fermentación se lleva a cabo con los mismos parámetros que en el Ejemplo 5. La composición de micronutrientes se agrega continuamente. Además, se agrega oxígeno puro al fermentador al 10-30% del flujo de aire para mantener constante el caudal total a 1.5 L/min para mantener baja la agitación y, por lo tanto, menos problemas de espuma. La concentración y el título de ramnolípidos (RL) se muestran en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9: Concentración y título de RL durante la fermentación semi-continua (Capa acuosa)

# de saque	% Inicial de aceite de soja	Tiempo de fermentación (entre saque) (h)	RL total (g/L)	Título de RL (g/L/h)
1	8.0%	95	74	0.78
2	6.1%	75	64	0.85
3	7.7%	92	73	0.79
4	6.1%	60	62	1.03
5	7.7%	83	71	0.85
6	6.1%	71	68	0.96
7	7.7%	89	77	0.86

Ejemplo 9: fermentación semicontinua de ramnolípidos en una escala de 100 L

100 L del medio de cultivo (composición como en el Ejemplo 5) se prepara como en el Ejemplo 1 y se esteriliza en un biorreactor de 120 L. Su composición se muestra en la Tabla 10. El cultivo de semillas de la cepa R4 se prepara de acuerdo con el Ejemplo 2. El fermentador de 100 l se inocula con 2.9 L de cepa R4 incubada en un matraz de agitación a 37 °C durante 24 horas en 20 g/l de caldo LB Lennox.

La fermentación se realiza a una temperatura de 37 °C con un pH inicial del medio de cultivo de 6.2 sin control de pH en el transcurso de la fermentación. El antiespumante a base de silicio (DOW AFE-1510) está diluido con agua desionizada al 50% y luego se esteriliza en autoclave antes de su uso. El antiespumante se agrega automáticamente para tumbar la espuma durante la fermentación. La agitación es a 150 rpm con 17 L/min de aire. La velocidad de agitación aumenta automáticamente según sea necesario para mantener el % de oxígeno disuelto (% OD) en 15% - 20%. 800 ml de micronutrientes preparados y una composición como en el Ejemplo 2 se diluyen con 2.2 L de agua desionizada y, por lo tanto, se alimentan continuamente a 375 ml/día durante 8 días.

70 L de medio de cultivo que contiene 9% de aceite de soja (composición en la Tabla 10 más adelante) se preparan como en el Ejemplo 1 y se esterilizan en un biorreactor de 100 L diferente, un día antes de sacarlos. Después de 105 horas posteriores a la inoculación, el pH comienza a aumentar después de permanecer constante alrededor de 7. La fermentación se completa a las 115 horas con un pH de 7.3.

Tabla 10: Composición del medio de cultivo de aceite de soja al 9 % (70 L)

Componente	Concentración
Goma arábica	4.50 g/L
Aceite de soja	90.00 g/L

85% H_3PO_4	9.69	g/L
99%NaOH	5.21	g/L
99%MgSO ₄ *7H ₂ O	0.50	g/L
99%KCl	1.00	g/L
99%NaNO ₃	15.00	g/L
98%H ₂ SO ₄	0.92	g/L
Agua desionizada	El resto	

5 Después de 115 horas posteriores a la inoculación, la bomba peristáltica se inicia para eliminar 70 L (70% del total) del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos. Una vez que se eliminan 70 L de caldo, lo que se denomina "Saque # 1", los 70 L recién esterilizados de medio de cultivo de aceite de soja al 9% se alimentan al fermentador usando una bomba peristáltica. El pH inicial de fermentación es 6.5. Se utilizan los parámetros de fermentación descritos en el párrafo anterior. En este caso, después de 70 horas, la fermentación se completa con un pH a 7.14. La concentración y el título de ramnolípidos (L) se muestran en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Concentración y título de RL (escala de 100 L)

# de saque	% Inicial de aceite de soja	Tiempo de fermentación (entre saque) (h)	RL total (g/L)	Título de RL (g/L/h)
1	8%	115	70	0.61
2	6.3%	70	75	1.07

10 Ejemplo 9: experimento del matraz de agitación sin micronutrientes

15 50 ml de medio de cultivo (composición a continuación) se prepara como en el Ejemplo 1 en un matraz de agitación de 250 ml. Su composición se muestra en la Tabla 12. Después de esterilizarse en autoclave y enfriarse a temperatura ambiente, los matraces de agitación se inoculan con 5% de caldo congelado de cepa R4. El caldo congelado se obtiene mezclando un 70% de cultivo en tubo de R4 con OD₆₀₀ de 3-4 con 30% de glicerol y almacenado a -80 °C. La incubación se lleva a cabo a 37 °C en un agitador durante 92 horas sin la adición de micronutrientes. Después de 92 horas posteriores a la inoculación, las concentraciones de ramnolípidos son en promedio de 47 ± 3 g/L para 5 matraces de agitación.

Tabla 12: Concentración de medio de cultivo para uso en fermentación sin micronutrientes

Componente	Concentración	
Goma arábica	6.00	g/L
Aceite de soja	60.00	g/L
85% H_3PO_4	9.69	g/L
99%NaOH	5.21	g/L
99%MgSO ₄ *7H ₂ O	0.50	g/L
99%KCl	1.00	g/L
99%NaNO ₃	15.00	g/L
98%H ₂ SO ₄	0.92	g/L
Agua desionizada	El resto	

20 Referencias:

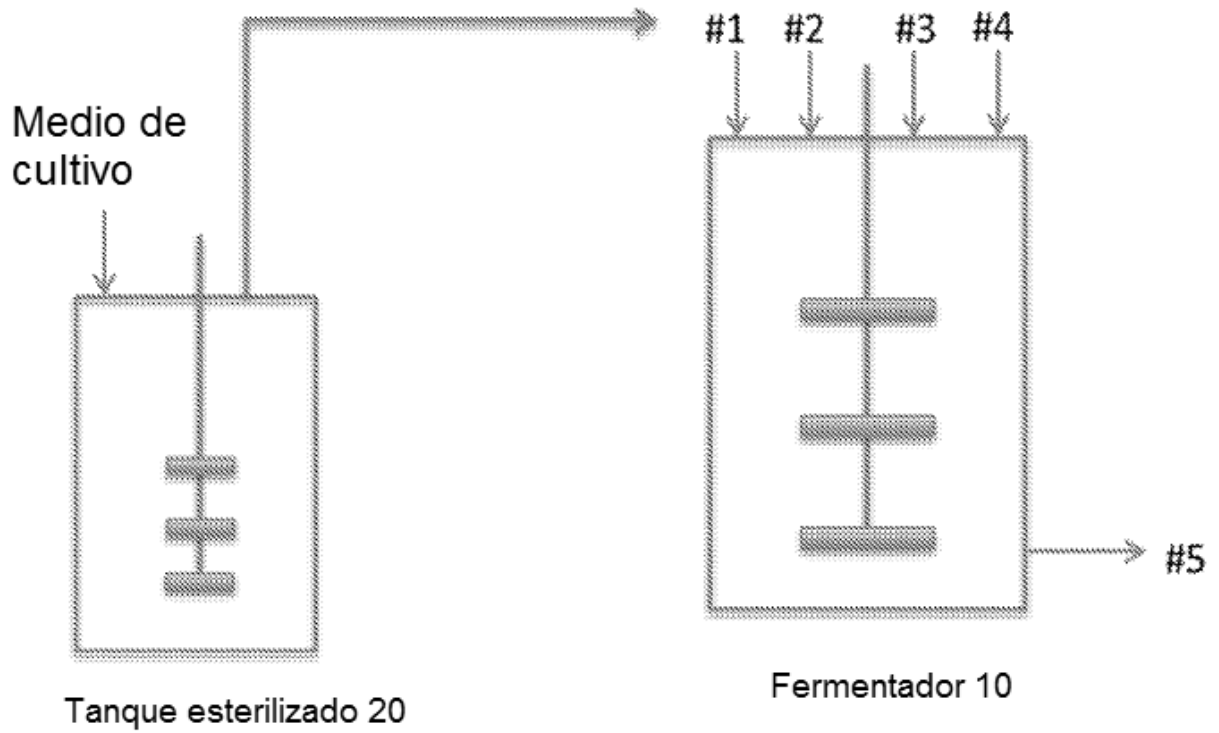
- [1] Randhawa et al. (2014) "Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market", *Frontiers en Microbiology* 5:1-7.
- [2] Muller et al. (2012) "Rhamnolipids-Next generation surfactants?", *J Biotechnol* 162(4):366-80.
- 5 [3] Banat et al. (2010) "Microbial biosurfactants production, applications and future potential" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:427-444
- [4] Wang et al (2007) "Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery" *Biotech. and Bioeng.* 98: 842-853.
- [5] Wittgens et al. (2011) "Growth independent Rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440" *Microbial Cell Factories* 10: 80-98.
- 10 [6] Nitschke et al (2011) "Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest" *Proc Biochem* 46: 621-630.
- [7] Gong et al (2015) "Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by *Pseudomonas aeruginosa* with plant oils" *Biotechnol Lett* 37: 2033-2038.
- 15 [8] Giani et al (1997) "*Pseudomonas Aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose" *Patente estadounidense # 5,658,973*.
- [9] Mcneil and Harvey (2008) "Practical fermentation technology" John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra.
- [10] Zhu et al (2012) "Enhanced Rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stagecontrolled fed-lote fermentation process, *Bioresource Technology* 117: 208-213.
- 20 [11] Ghomi et al (2012) "Comparison entre lote and fed-lote production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*" *Iranian J Biotech* 10: 263-269.
- [12] Camilios et al (2009) "Production of Rhamnolipids in solid-state cultivation: characterization downstream processing and application in the cleaning of contaminated soil" *Biotechnol J* 4: 748-755.
- [13] Daniels et al., (1988). "Method for producing rhamnose". *Patente Europea EP0282942*.
- [14] Kaepeli et al (1986). "Process for the production of Rhamnolipids. *Patente estadounidense # US4628030*.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento semicontinuo para producir una pluralidad de medios de fermentación que comprenden uno o más ramnolípidos que comprende:
 - 5 (a) Cultivar un microorganismo productor de ramnolípidos en medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono; al menos una fuente de nitrógeno, al menos una fuente de fósforo, al menos una fuente de magnesio, al menos una fuente de potasio, al menos una fuente de azufre, al menos una fuente de cloruro y al menos una fuente de sodio, entre 2 y 5 días para obtener un primer medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos;
 - (b) Eliminar al menos entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 90 % del volumen total del medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos obtenidos en (a);
 - 10 (c) Reemplazar dicho medio de fermentación que comprende uno o más ramnolípidos eliminados en (b) con medio de cultivo que tiene la composición expuesta en la etapa (a);
 - (d) Repetir los pasos (a) - (c) al menos una vez para obtener un medio de fermentación subsiguiente que comprende ramnolípidos

15 en donde se producen al menos 45 g/l de ramnolípidos; en donde dichos pasos (a) - (c) pueden repetirse durante al menos 30 días y en donde dicho microorganismo productor de ramnolípidos es *Pseudomonas aeruginosa*.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual dicho medio de cultivo en el paso (a) comprende además un emulsionante.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1-2, en el cual dicho procedimiento comprende además agregar a dicho medio de cultivo en el paso (a) (1) una composición que comprende uno o más micronutrientes a una concentración de no más de 20 mg/L de solución de micronutrientes a 0.1 % v/v del volumen total de fermentación por día y/o (2) anti-espumante.
- 20 4. El procedimiento según las reivindicaciones 1-3, en el cual dicho emulsionante está presente en una cantidad de 0.1-20 % en peso, dicha fuente de carbono está presente a una concentración de 6-12 % en peso, dicha fuente de nitrógeno está presente en una cantidad de 1-4 g/L, dicha Fuente de fósforo está presente en una cantidad de 1-3 g/L,
- 25 dicho ion de magnesio está presente en una cantidad de 0.001-0.2 g/L, dicho ion de potasio está presente en una cantidad de 0.1 a 1 g/L, dicho ion de sodio está presente en una cantidad de 1-10 g/L, dicho ion de cloruro está presente en una cantidad de 0.1-1 g/L, dicho ion de azufre está presente en una cantidad de 0.1-1 g/L.
5. El procedimiento según las reivindicaciones 1-4, en el cual en dicho medio de cultivo del paso (a), dicha fuente de carbono es glucosa, alcohols grasos, acidos grasos o un aceite vegetal, dicha fuente de nitrógeno es NaNO_3 , urea o NH_4Cl ; dicha fuente de fósforo es H_3PO_4 K_2HPO_4 ; dicha fuente de magnesio es $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o MgCl_2 ; dicha fuente de potasio es KCl o KOH , dicha fuente de azufre es H_2SO_4 ; dicha fuente de cloruro es KCl o NaCl , dicha fuente de sodio es NaCl , NaNO_3 , o NaOH y/o dicho emulsionante es goma arábica, goma guar o ramnolípidos.
- 30 6. El procedimiento según las reivindicaciones 1-5, en el cual dicho aceite vegetal es aceite de oliva, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de canola o aceite de soja.
7. El procedimiento según las reivindicaciones 1-6, en el cual dicho micronutriente es una sal de Fe, una sal de Mn, Zn, una sal de Na, o una sal de Cu.
- 35 8. El procedimiento según las reivindicaciones 1-7, en el cual dicha sal de Cu está presente en una cantidad de 0.5-3 g/L de solución de micronutrientes; dicho Mn está presente en una cantidad de 0.1-1.5 g/L de solución de micronutrientes, dicha sal de Zn está presente en una cantidad de 0.5 g/L, dicha sal de Fe está presente en una cantidad de 0.1-1 g/L de solución de micronutrientes y/o dicha sal de sodio está presente en una cantidad de 1-5 g/L de solución de micronutrientes.
- 40 9. El procedimiento según las reivindicaciones 1-8, en el cual dicha sal de Fe es $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o FeSO_4 , dicha sal de Mn es $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o $\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; dicha sal de Zn es $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o ZnCl_2 , dicha sal de Na es $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ o $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ y/o dicha sal de Cu es $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 45 10. El procedimiento según las reivindicaciones 1-9, en el cual dicha composición de micronutrientes se agrega continuamente.
11. El procedimiento según las reivindicaciones 1-10, en el cual dicha composición de micronutrientes se agrega diariamente.
- 50 12. El procedimiento según las reivindicaciones 1-11, en el cual dicha *P. aeruginosa* se cultiva a una temperatura de 30-37 °C y/o a pH de 6-8,6.
13. El procedimiento según las reivindicaciones 1-12, en el cual el paso (d) se repite durante al menos 30 días.

14. El procedimiento según la reivindicación 3-13 en el cual dicho anti-espumante es un anti-espumante a base de carbono o a base de silicio.



Línea #	Entrada	Salida
1	Inóculo	
1	Medio de cultivo esterilizado	
2	Micronutriente	
3	Antiespumante	
4	Aire y/o O ₂	
5		Caldo de fermentación

Figura 1

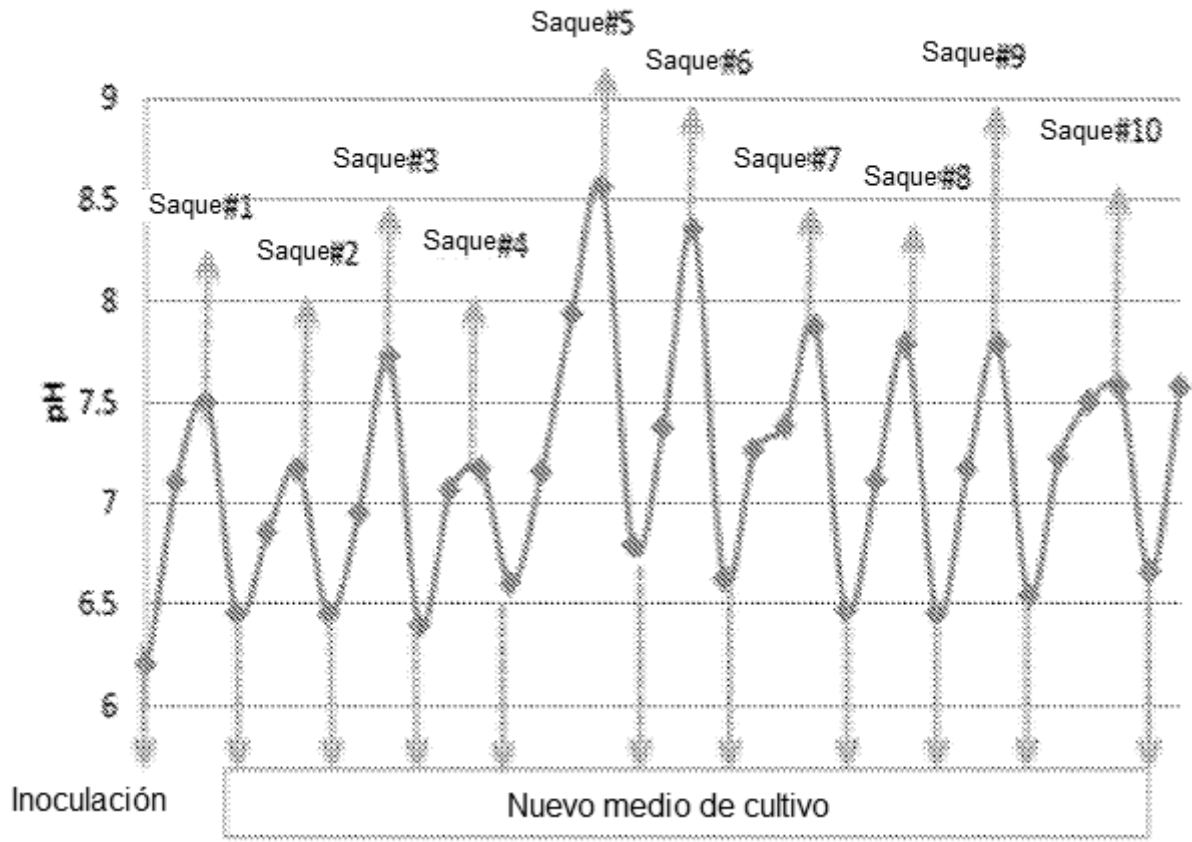


Figura 2

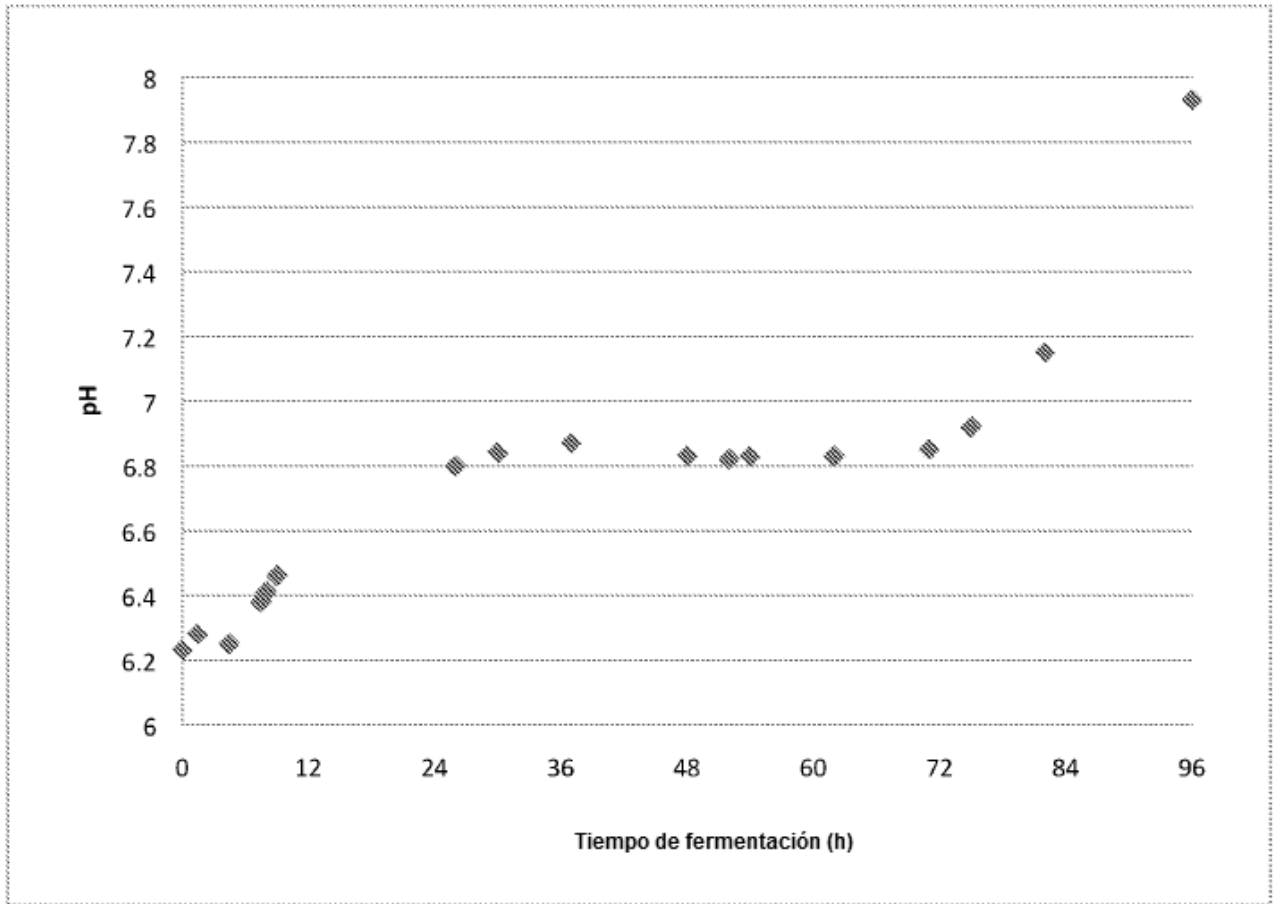


Figura 3