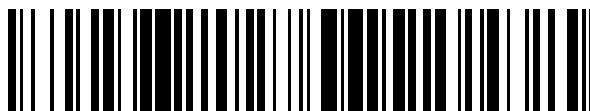


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 930**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/US2012/040327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13002949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12726321 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2726598**

54 Título: **Proceso para la fermentación de gas de síntesis**

30 Prioridad:

30.06.2011 US 201161571564 P

30.06.2011 US 201161571565 P

13.09.2011 US 201161573845 P

15.05.2012 US 201213471827

15.05.2012 US 201213471858

16.05.2012 US 201213473167

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

04.05.2017

73 Titular/es:

INEOS BIO SA (100.0%)

Avenue Des Uttins 3

1180 Rolle, CH

72 Inventor/es:

BELL, PETER SIMPSON y

KO, CHING-WHAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 610 930 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

Proceso para la fermentación de gas de síntesis

5 Se proporciona un proceso para la fermentación de gas de síntesis. Más específicamente, el proceso incluye propagar un cultivo efectivo para su uso como un inóculo para un reactor principal y fermentar gas de síntesis en el reactor principal.

Antecedentes

10 Los microorganismos anaeróbicos pueden producir etanol a partir de monóxido de carbono (CO) a través de la fermentación de sustratos gaseosos. Las fermentaciones que utilizan microorganismos anaeróbicos a partir del género *Clostridium* producen etanol y otros productos de utilidad. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5,173,429 describe el *Clostridium ljungdahlii* ATCC N° 49587, un microorganismo que produce etanol y acetato a partir de un gas de síntesis. La patente de EE.UU. N° 5,807,722 describe un método y un aparato para convertir gases residuales en ácidos orgánicos y alcoholes utilizando *Clostridium ljungdahlii* ATCC N° 55380. La patente de EE.UU. N° 6,136,577 describe un método y un aparato para convertir gases residuales en etanol utilizando *Clostridium ljungdahlii* (ATCC N° 55988 y 55989).

15 El CO se aporta a menudo a la fermentación como parte de un sustrato gaseoso en forma de un gas de síntesis. La gasificación de materiales carbonosos para producir gas pobre o gas de síntesis o Sintegas que incluye monóxido de carbono e hidrógeno, se conoce bien en el arte. Habitualmente, dicho proceso de gasificación implica una oxidación parcial u oxidación por defecto de aire ("starved-air") de material carbonoso en la que se suministra una cantidad sub-estequiométrica de oxígeno al proceso de gasificación para promover la producción de monóxido de carbono según se describe en la memoria WO 2009/154788.

20 En Kundiyana et al. (Journal of Bioscience and Bioengineering 109 (2010) páginas 492-498) se divulga la fermentación de un gas de síntesis en un fermentador a una escala experimental, en donde la preparación del inóculo para el fermentador implica una transferencia repetida del inóculo.

25 El proceso de fermentación con bacterias acetogénicas puede incluir uno o más reactores de siembra, uno o más reactores de crecimiento y al menos un reactor principal. Las bacterias acetogénicas se cultivan habitualmente hasta alcanzar una cierta densidad celular en un reactor de siembra. El reactor de siembra se utiliza a continuación para inocular un fermentador de crecimiento. El fermentador de crecimiento será habitualmente de mayor tamaño que el reactor de siembra. Las bacterias acetogénicas en el reactor de crecimiento se cultivan entonces hasta alcanzar una densidad celular deseada. El reactor de crecimiento puede ser utilizado entonces para inocular otro reactor de crecimiento de mayor tamaño o puede ser utilizado para inocular un reactor principal. El reactor principal será de un tamaño mayor que el reactor de crecimiento. En vista de este proceso, inocular un reactor principal comenzando a partir de un reactor de siembra requiere tiempo. Además, si un reactor de crecimiento falla, es necesario volver a empezar el proceso, lo que requiere aún más tiempo.

Resumen

35 Se proporciona un proceso para la fermentación de gas de síntesis que es efectivo para reducir la cantidad de tiempo necesaria para inocular un reactor principal. En este aspecto, se reduce el tiempo total desde la inoculación de un reactor de siembra hasta la inoculación de un reactor principal. El proceso también proporciona un reinicio más rápido en el caso de un fallo del reactor.

40 En un aspecto, se proporciona un proceso para la fermentación de un gas de síntesis que incluye propagar un cultivo de bacterias acetogénicas efectivas para inocular un reactor principal. La propagación incluye: i) inocular un primer cultivo de bacterias acetogénicas en un pre-reactor para proporcionar una densidad celular viable mínima, y ii) cultivar un cultivo de bacterias acetogénicas en el pre-reactor para proporcionar una densidad celular diana del pre-reactor. La propagación puede además describirse por las siguientes ecuaciones: (a) en donde, si (la densidad celular diana del pre-reactor multiplicada por el volumen del pre-reactor) ÷ (un volumen del reactor principal multiplicado por (un volumen del pre-reactor ÷ un volumen del pre-reactor que se transfiere)) es mayor o igual a una densidad celular viable mínima, transferir un volumen del pre-reactor al reactor principal en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular viable mínima en el reactor principal, o (b) si (la densidad celular diana del pre-reactor multiplicada por el volumen del pre-reactor) ÷ (un volumen del reactor principal multiplicado por (un volumen del pre-reactor ÷ un volumen del pre-reactor que se transfiere)) es menor que una densidad celular viable mínima, transferir un volumen del pre-reactor a un pre-reactor posterior en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular viable mínima en el pre-reactor posterior. El paso ii se repite hasta que un volumen del pre-reactor se transfiere al reactor principal, y en donde de un 25% a un 75% del volumen de un pre-reactor se utiliza para inocular un pre-reactor posterior o reactor principal, mientras que el volumen restante se mantiene para su uso

para la re-inoculación en caso de que hubiera cualquier fallo posterior del reactor. La fermentación del gas de síntesis se lleva a cabo a continuación en el reactor principal.

En un aspecto, se divulga un proceso para fermentar gas de síntesis que incluye propagar un cultivo de bacterias acetogénicas efectivo para inocular un reactor principal. La propagación incluye: i) inocular un primer cultivo de bacterias acetogénicas en un pre-reactor para proporcionar una densidad celular viable mínima, y ii) cultivar el cultivo de bacterias acetogénicas en el pre-reactor para proporcionar una densidad celular diana del pre-reactor. La propagación puede además describirse mediante las siguientes ecuaciones: (a) en donde, si (la densidad celular diana del pre-reactor multiplicada por el volumen del pre-reactor) ÷ (un volumen del reactor principal multiplicado por (un volumen del pre-reactor ÷ un volumen del pre-reactor que se transfiere)) es mayor que o igual a una densidad celular viable mínima, transferir un volumen del pre-reactor al reactor principal en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular viable mínima en el reactor principal, o (b) si (la densidad celular diana del pre-reactor multiplicada por el volumen del pre-reactor) ÷ (un volumen del reactor principal multiplicado por (un volumen del pre-reactor ÷ un volumen del pre-reactor que se transfiere)) es menor que una densidad celular viable mínima, ajustar el volumen del reactor principal y transferir un volumen del pre-reactor al reactor principal en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular viable mínima en el reactor principal, y aumentar el volumen del reactor principal a la vez que se mantiene una densidad celular viable mínima. La fermentación de gas de síntesis se lleva a cabo a continuación en el reactor principal.

En otro aspecto, se divulga un proceso para iniciar un fermentador principal para la fermentación de gas de síntesis. El proceso incluye inocular un primer cultivo de bacterias acetogénicas en un reactor de siembra para proporcionar una densidad celular viable inicial mínima en el reactor de siembra de al menos aproximadamente 0,2 gramos por litro. El cultivo de bacterias acetogénicas se cultiva con gas de síntesis para proporcionar una densidad celular en el reactor de siembra de al menos aproximadamente 5 gramos por litro. Un primer reactor de crecimiento se inocula con un inóculo procedente del reactor de siembra en una cantidad para proporcionar una densidad efectiva de una densidad celular en el reactor de crecimiento de al menos aproximadamente 0,2 gramos por litro. El cultivo se cultiva con gas de síntesis para proporcionar una densidad celular en el primer reactor de crecimiento de al menos aproximadamente 5 gramos por litro. Un segundo reactor de crecimiento se inocula con un inóculo procedente del primer reactor de crecimiento en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular en el reactor de crecimiento de al menos aproximadamente 0,2 gramos por litro. El cultivo se cultiva con gas de síntesis para proporcionar una densidad celular en el segundo reactor de crecimiento de al menos aproximadamente 5 gramos por litro. Un fermentador principal se inocula con un inóculo del segundo reactor de crecimiento en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular en el reactor principal de al menos aproximadamente 0,2 gramos por litro.

Breve descripción de las figuras

Los aspectos anteriores y otros aspectos, características y ventajas de diversos aspectos del proceso resultarán más evidentes a partir de la siguiente figura.

La Figura 1 ilustra un proceso para fermentar gas de síntesis.

Caracteres de referencia correspondientes indican correspondientes componentes en las diversas vistas de los dibujos. Los expertos en el arte apreciarán que los elementos en las figuras se ilustran por razones de simplicidad y claridad y no han sido necesariamente dibujados a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos en las figuras pueden verse exagerados en relación a otros elementos para ayudar a mejorar la comprensión de diversos aspectos del presente proceso y aparato. También, los elementos comunes pero bien entendidos que son de utilidad o necesarios en aspectos comercialmente factibles, a menudo no se representan para facilitar una vista menos obstaculizada de estos aspectos diversos.

Descripción detallada

La siguiente descripción no ha de tomarse en un sentido limitativo, sino que está realizada simplemente con el propósito de describir los principios generales de los ejemplos de realizaciones. El alcance de la invención debe ser determinado en referencia a las reivindicaciones.

Se proporciona una serie de uno o más pre-reactores que son efectivos para proporcionar rápidamente un inóculo a un reactor principal. Los uno o más pre-reactores se encuentran conectados operativamente para permitir transferir el cultivo. Cada uno del uno o más pre-reactores se inocula con una densidad celular viable mínima y a continuación se cultiva para proporcionar una densidad celular diana para su posterior inoculación. Un volumen de aproximadamente un 25% hasta aproximadamente un 75% de cualquier pre-reactor se transfiere a un reactor posterior. El volumen restante se mantiene y puede utilizarse para la re-inoculación en caso de que hubiera un fallo posterior del reactor.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los siguientes términos tal como se utilizan a lo largo de la especificación para la presente revelación se definen como sigue a continuación y pueden incluir ya sea formas en singular como en plural de las definiciones definidas a continuación:

5 El término "aproximadamente" modificando cualquier cantidad hace referencia a la variación en dicha cantidad que se encuentra en condiciones reales, por ejemplo, en el laboratorio, planta piloto, o instalación de producción. Por ejemplo, una cantidad de un ingrediente o medida empleada en una mezcla o cantidad cuando está modificada por el término "aproximadamente", incluye la variación y el grado de detalle habitualmente empleado en la medición en condiciones experimentales en una planta de producción o un laboratorio. Por ejemplo, la cantidad de un componente de un producto cuando está modificado por el término "aproximadamente" incluye la variación entre lotes en experimentos múltiples en la planta o laboratorio y la variación inherente en el método analítico. Ya sea modificado o no por el término "aproximadamente", las cantidades incluyen equivalentes a esas cantidades. Cualquier cantidad establecida en la presente patente y modificada por el término "aproximadamente" puede también emplearse en la presente divulgación como la cantidad no modificada por "aproximadamente".

"Material carbonoso" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un material rico en carbono tal como el carbón, y los productos petroquímicos. Sin embargo, en esta especificación, el término material carbonoso incluye cualquier material de carbono ya sea es estado sólido, líquido, gaseoso, o de plasma. Entre los numerosos elementos que pueden considerarse material carbonoso, la presente revelación contempla:

20 material carbonoso, producto líquido carbonoso, reciclaje de líquido industrial carbonoso, residuos sólidos urbanos carbonosos (RSU), residuos urbanos carbonosos, material carbonoso de origen agrícola, material carbonoso de origen forestal, residuos carbonosos de madera, material carbonoso de construcción, material carbonoso vegetal, residuos industriales carbonosos, residuos carbonosos de fermentación, co-productos petroquímicos carbonosos, co-productos carbonosos de la producción de alcohol, carbón carbonoso, neumáticos, plásticos, residuos plásticos, alquitrán de coque, Fibersoft, lignina, licor negro, residuos poliméricos, tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), lodos de aguas residuales, residuos animales, residuos de cosecha, cultivos energéticos, residuos de procesamiento forestal, residuos de procesamiento de madera, residuos de ganado, residuos avícolas, residuos de procesamiento de alimentos, residuos de procesos fermentativos, co-productos de etanol, afrecho, microorganismos previamente utilizados, o sus combinaciones.

El término "fibersoft" o "Fibersoft" o "fibrosoft" o "fibrousoft" hace referencia a un tipo de material carbonoso que se produce como resultado del reblandecimiento y la concentración de diversas sustancias; en un ejemplo, se produce material carbonoso mediante esterilización por vapor en autoclave de diversas sustancias. En otro ejemplo, el fibersoft puede incluir esterilización por vapor en autoclave de residuos urbanos, industriales, comerciales y médicos que dan como resultado un material fibroso pastoso.

El término "residuos sólidos urbanos" o "RSU" hace referencia a residuos que pueden incluir desechos domésticos, comerciales, industriales y/o residuales.

40 El término "Sintegas" o "gas de síntesis" hace referencia a gas de síntesis que es el nombre otorgado a una mezcla de gas que contiene diversas cantidades de monóxido de carbono e hidrógeno. Ejemplos de métodos de producción incluyen el reformado con vapor de gas natural o hidrocarburos para producir hidrógeno, la gasificación de carbón y algunos tipos de instalaciones de gasificación mediante el aprovechamiento energético de desechos. El nombre viene de su uso como productos intermedios a la hora de crear gas natural sintético (SNG, por sus siglas en inglés) y para producir amoniaco o metanol. El Sintegas comprende su uso como un producto intermedio a la hora de producir petróleo sintético para su uso como combustible o lubricante, mediante síntesis Fischer-Tropsch y previamente el proceso Mobil para la producción de gasolina a partir de metanol. El gas de síntesis consta de principalmente hidrógeno, monóxido de carbono, y algo de dióxido de carbono, y presenta menos de la mitad de la densidad energética (es decir, contenido en BTU) de gas natural. El gas de síntesis es combustible y a menudo se utiliza como una fuente de combustible o como un producto intermedio para la producción de otros productos químicos.

50 Los términos "fermentación", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de productos del proceso. En un aspecto, la fermentación hace referencia a la conversión de CO a alcohol.

Diseño del pre-reactor

De acuerdo con el proceso, se inocula un cultivo de bacterias acetogénicas en un pre-reactor para proporcionar una densidad celular mínima. En este aspecto, el pre-reactor puede ser uno o más reactores de siembra y uno o más reactores de crecimiento. El reactor de siembra puede presentar un volumen de aproximadamente 500 litros o menos, en otro aspecto, aproximadamente 400 litros o menos, en otro aspecto aproximadamente 300 litros o menos, en otro aspecto, aproximadamente 200 litros o menos, en otro aspecto, aproximadamente 100 litros o menos, y en otro aspecto, aproximadamente 50 litros o menos. Los reactores de crecimiento pueden presentar un volumen de aproximadamente 250.000 litros o menos, en otro aspecto aproximadamente 150.000 litros o menos, en otro aspecto, aproximadamente 100.000 litros o menos, en otro aspecto, aproximadamente 50.000 litros o menos, en otro aspecto, aproximadamente 10.000 litros o menos, y en otro aspecto, aproximadamente 1.000 litros o menos. Tal como se utiliza en la presente patente, "volumen" hace referencia a un volumen de trabajo líquido no gaseado.

El reactor de siembra puede ser suministrado con gas de síntesis, incluyendo por ejemplo gas de síntesis embotellado. En este aspecto, utilizar un reactor de siembra con un volumen de 500 litros o menos permite que el reactor de siembra sea suministrado con gas de síntesis embotellado. El uso de gas de síntesis embotellado puede ser importante si un suministro de gas de síntesis procedente de un proceso de gasificación no está disponible. En la presente patente se describen composiciones de gas de síntesis de utilidad. En un aspecto, los pre-reactores pueden suministrarse con gas reciclado del reactor principal.

El cultivo en el reactor de siembra se cultiva hasta una densidad celular diana del pre-reactor y se utiliza un volumen del reactor de siembra para inocular un pre-reactor posterior con un volumen mayor que el reactor de siembra. En este aspecto, el segundo pre-reactor puede ser uno o más reactores de crecimiento. En un aspecto importante, el proceso utilizó al menos dos reactores de crecimiento, en otro aspecto, al menos tres reactores de crecimiento, y en otro aspecto al menos cuatro reactores de crecimiento.

Un aspecto del proceso para la fermentación de gas de síntesis se ilustra en general en la Figura 1. En este aspecto, el proceso incluye un reactor de siembra 100, un primer reactor de crecimiento 200, un segundo reactor de crecimiento 300, y un reactor principal 400. Cada reactor puede suministrarse con gas de síntesis mediante un suministro de gas 500. Pueden suministrarse nutrientes a cada reactor a través de un suministro de nutrientes 600. Cada reactor puede incluir un agitador 150 y al menos un rodete 250. Puede enviarse medio desde cada reactor a un enfriador/intercambiador de calor 550 y el medio enfriado puede hacerse circular de regreso al recipiente del reactor. Puede transferirse medio desde un reactor al siguiente reactor a través de una conducción de transferencia 700.

Puede enviarse medio desde cada reactor a un filtro de recirculación 350. Las células concentrada 425 pueden hacerse retornar al recipiente y el permeado 450 puede ser enviado para su procesamiento adicional. El procesamiento adicional puede incluir la separación del producto deseado tal como por ejemplo etanol, ácido acético y butanol.

Operación del pre-reactor

La operación del pre-reactor permite un inicio rápido de la inoculación del reactor principal. En este aspecto, el tiempo desde la inoculación de un primer pre-reactor hasta la inoculación de un reactor principal es de aproximadamente 20 días o menos, en otro aspecto, aproximadamente 15 días o menos, y en otro aspecto, aproximadamente 10 días o menos. El proceso también permite una recuperación más rápida si hubiera cualquier fallo en los pre-reactores.

De acuerdo con el proceso, un cultivo de bacterias acetogénicas es inoculado en un pre-reactor o reactor de siembra para proporcionar una densidad celular mínima. Tal como se utiliza en la presente patente, "densidad celular mínima" significa una densidad celular viable de al menos aproximadamente 0,1 gramos por litro, en otro aspecto, al menos aproximadamente 0,2 gramos por litro, en otro aspecto, al menos aproximadamente 0,3 gramos por litro, en otro aspecto, al menos aproximadamente 0,4 gramos por litro, y en otro aspecto, al menos aproximadamente 0,5 gramos por litro. La densidad celular mínima no excederá de aproximadamente 1,2 gramos por litro. En otro aspecto, el primer cultivo utilizado para inocular un pre-reactor o reactor de siembra presenta un valor de pH de 6,5 o menos, en otro aspecto de 4,5 o menos, y en otro aspecto, aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 4,5. El primer cultivo utilizado para inocular un pre-reactor o un reactor de siembra presenta una concentración de ácido acético de aproximadamente 10 gramos por litro o menos, en otro aspecto, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 gramos por litro, en otro aspecto, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 gramos por litro, en otro aspecto, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 gramos por litro, y en otro aspecto, aproximadamente 2 gramos por litro.

Las bacterias acetogénicas se cultivan en un pre-reactor hasta que se logra una densidad celular diana. Tal como se utiliza en la presente patente, "densidad celular diana del pre-reactor" significa una densidad celular viable de al menos aproximadamente 5 gramos por litro, en otro aspecto, al menos aproximadamente 10 gramos por litro, en otro aspecto, al menos aproximadamente 15 gramos por litro, y en otro aspecto, al menos aproximadamente 20 gramos por litro. La densidad celular diana del pre-reactor generalmente no excederá de aproximadamente 50 gramos por litro. En otro aspecto, la densidad celular diana del pre-reactor es de aproximadamente 12 hasta

aproximadamente 15 gramos por litro, y en otro aspecto, de aproximadamente 20 a aproximadamente 24 gramos por litro.

5 En un aspecto, cada pre-reactor posterior tiene un volumen mayor que el pre-reactor anterior. De acuerdo con este proceso, una relación en volumen del volumen del pre-reactor transferido a un pre-reactor posterior o un reactor principal es de aproximadamente 0,02 hasta aproximadamente 0,5, y en otro aspecto, de aproximadamente 0,02 hasta aproximadamente 0,2. En otro aspecto, de aproximadamente un 20 hasta aproximadamente un 75% del volumen de un pre-reactor se utiliza para inocular un pre-reactor posterior o un reactor principal. Otros volúmenes del reactor que pueden transferirse incluyen de aproximadamente un 30 hasta aproximadamente un 70%, aproximadamente un 40 hasta aproximadamente un 60%, y aproximadamente un 45 hasta aproximadamente un 10 55%. En este aspecto, mantener un volumen permite una recuperación más rápida en caso de que hubiera un fallo del reactor. Tal como se utiliza en la presente patente, "fallo del reactor" hace referencia a una condición en la que no está teniendo lugar ninguna conversión de gas y pueden verse células muertas tras una evaluación en el microscopio. En este aspecto, una vez que ocurre un fallo en el reactor, el reactor puede volver a inocularse dentro de un periodo de 24 horas.

15 Al alcanzar una densidad celular diana en un pre-reactor, los pasos posteriores en el proceso pueden describirse tal como sigue a continuación:

$$\text{Si } \frac{(\text{densidad celular diana del pre-reactor}) \times (\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del reactor principal}) \times \left[\frac{(\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del pre-reactor transferido})} \right]} \geq \text{densidad celular viable mínima}$$

entonces un volumen del pre-reactor se transfiere a un reactor principal en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular mínima en el reactor principal; o

$$\text{si } \frac{(\text{densidad celular diana del pre-reactor}) \times (\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del reactor principal}) \times \left[\frac{(\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del pre-reactor transferido})} \right]} \leq \text{densidad celular viable mínima}$$

20 entonces un volumen del pre-reactor se transfiere a un pre-reactor posterior en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular mínima en el reactor principal. Este paso de transferencia de un pre-reactor a otro puede repetirse hasta transferir al reactor principal.

25 En otro aspecto, al alcanzar una densidad celular diana en un pre-reactor, los pasos posteriores en el proceso pueden describirse tal como sigue a continuación:

$$\text{si } \frac{(\text{densidad celular diana del pre-reactor}) \times (\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del reactor principal}) \times \left[\frac{(\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del pre-reactor transferido})} \right]} \geq \text{densidad celular viable mínima}$$

Entonces un volumen del pre-reactor se transfiere a un reactor principal en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular mínima en el reactor principal; o

$$\text{si} \frac{(\text{densidad celular diana del pre-reactor}) \times (\text{volumen del reactor})}{(\text{volumen del reactor principal}) \times \left[\frac{(\text{volumen del pre-reactor})}{(\text{volumen del pre-reactor transferido})} \right]} \text{ve} \text{ densidad celular viable mínima}$$

entonces puede ajustarse un volumen del reactor principal y un volumen del pre-reactor puede ser transferido en una cantidad para proporcionar una densidad celular viable mínima en el reactor principal. El volumen del reactor principal es entonces incrementado en el tiempo hasta alcanzar un volumen deseado, a la vez que se mantiene una densidad celular viable mínima.

Cada reactor puede ser operado de una forma efectiva para maximizar el crecimiento celular y mantener la salud del cultivo. En un aspecto, el medio utilizado en cada reactor puede ser el mismo o diferente. Entre los ejemplos de medios adecuados se incluyen aquellos descritos en la patente de EE.UU. Nº 7,285,402, PCT/US2009/001522, y solicitudes de patente provisional de EE.UU. Nos. 61/458,899, 61/458,903, y 61/458,976, todas presentadas el 3 de diciembre de 2010. Pueden utilizarse niveles de concentración más elevados o más vitaminas durante la fase de crecimiento.

En un aspecto, un reactor de siembra puede ser inoculado con aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7 gramos de células por litro. El gas de síntesis puede rociarse en el reactor de siembra a una tasa de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 litros por minuto, en otro aspecto, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,25 litros por minuto. La agitación inicial se realiza a aproximadamente un 10 hasta aproximadamente un 40% de la potencia de agitación completa. Las velocidades de agitación pueden aumentarse hasta una potencia completa en una hora. Por ejemplo, las velocidades de agitación pueden aumentar desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 rpm para reactores más pequeños, y los incrementos pueden ser correspondientemente menores para reactores más grandes.

Bacterias acetogénicas

En otro aspecto, los microorganismos utilizados incluyen bacterias acetogénicas. Ejemplos de bacterias acetogénicas de utilidad incluyen aquellas del género *Clostridium*, tal como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo aquellas descritas en WO 2000/68407, EP 117309, patente de EE.UU. Nos. 5,173,429, 5,593,886 y 6,368,819, WO 1998/00558 y WO 2002/08438, cepas de *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061 y DSM 19630 de DSMZ, Alemania) incluyendo aquellas descritas en WO 2007/117157 y WO 200911/S1342 y *Clostridium ragsdalei* (P11, ATCC BAA-622) y *Alkalibaculum bacchi* (CP11, ATCC BAA-1772) incluyendo aquellas descritas respectivamente en la patente de EE.UU. Nº 7,704,723 y en "Biofuels and Bioproducts from Biomass-Generated Synthesis Gas", Hasan Atiyeh, presentada en Oklahoma EPSCoR Annual State Conference, 29 de abril de 2010 y *Clostridium carboxidivorans* (ATCC PTA-7827) descrita en la solicitud de patente de EE.UU. Nº 2007/0276447. Otros microorganismos adecuados incluyen aquellos del género *Moorella*, incluyendo *Moorella sp.* HUC22-1, y aquellas del género *Carboxydotherraus*. Cada una de estas referencias se incorpora en la presente patente a modo de referencia. Pueden utilizarse cultivos mezclados de dos o más microorganismos.

Algunos ejemplos de bacterias de utilidad incluyen *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobium raoterae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldaranaerobacter subterraneus pacificus*, *Carboxydotherraus hydrogenoformans*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acetobutylicum P262* (DSM 19630 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 19630 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 23693 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 24138 de DSMZ Alemania), *Clostridium carboxidivorans P7* (ATCC PTA-7827), *Clostridium coscatii* (ATCC PTA-10522), *Clostridium drakei*, *Clostridium ljungdahlii* PETC (ATCC 49587), *Clostridium ljungdahlii* ER12 (ATCC 55380), *Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988), *Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55889), *Clostridium magnum*, *Clostridium pasteurianum* (DSM 525 de DSMZ Alemania), *Clostridium ragsdali* P11 (ATCC BAA-622), *Clostridium scatologenes*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium ultunense*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Eubacterium limosun*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Morrella thermoacetica*, *Morrella thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Rumiraococcus productus*, *Thermoanaerobacter kivui*, y mezclas de los mismos.

Gas de síntesis

El gas de síntesis puede proporcionarse a partir de cualquier otra fuente. En un aspecto, el gas de síntesis puede tener su origen en la gasificación de materiales carbonosos. La gasificación implica una combustión parcial de la

5 biomasa en un suministro de oxígeno restringido. El gas resultante incluye principalmente CO y H₂. En este aspecto, el gas de síntesis contendrá al menos aproximadamente un 10% mol de CO, en un aspecto, al menos aproximadamente un 20 % mol a aproximadamente un 100 % mol de CO, en un aspecto, al menos aproximadamente un 30 % mol a aproximadamente un 90 % mol de CO, en un aspecto, al menos aproximadamente un 40 % mol a aproximadamente un 80 % mol de CO, y en otro aspecto, al menos aproximadamente un 50 % mol a aproximadamente un 70 % mol de CO. El gas de síntesis presentará una relación molar de CO/CO₂ de al menos aproximadamente 0,75. Se proporcionan algunos ejemplos de métodos y aparatos de gasificación adecuados en las solicitudes de EE.UU. con número 61/516,667, 61/516,704 y 61/516,646, todas las cuales fueron presentadas el 6 de abril de 2011.

10 En otro aspecto, el gas de síntesis utilizado para propagar las bacterias acetogénicas puede ser sustancialmente CO. Tal como se utiliza en la presente patente, "sustancialmente CO" significa al menos aproximadamente un 50 % mol de CO, en otro aspecto, al menos aproximadamente un 60% mol de CO, en otro aspecto, al menos aproximadamente un 70% mol de CO, en otro aspecto, al menos aproximadamente un 80% mol de CO, y en otro aspecto, al menos aproximadamente un 90% mol de CO.

15 Ejemplo 1: Inicio con dos reactores de crecimiento

Un fermentador de siembra (90 litros) es inoculado con *Clostridium ljungdahlii*. El gas de síntesis fue fermentado hasta obtener una densidad celular de aproximadamente 12 gramos/litro. La mitad del fermentador de siembra (45 litros) se utiliza para inocular un primer reactor de crecimiento para proporcionar un volumen total en el primer reactor de crecimiento de aproximadamente 1390 litros y una densidad celular de partida de aproximadamente 0,38
20 gramos por litro. El gas de síntesis se fermenta durante 140 horas a partir del tiempo de inoculación para proporcionar una densidad celular de aproximadamente 12 gramos por litro. El cultivo del primer reactor de crecimiento (aproximadamente 703 litros) se utiliza para inocular un segundo reactor de crecimiento para proporcionar un volumen total en el segundo reactor de crecimiento de aproximadamente 22200 litros y una densidad celular de aproximadamente 0,38 gramos por litro. El gas de síntesis se fermenta durante 140 horas a
25 partir del tiempo de inoculación para proporcionar una densidad celular de aproximadamente 12 gramos por litro. El cultivo del segundo reactor de crecimiento (aproximadamente 12.000 litros) se utiliza para inocular un reactor principal para proporcionar un volumen total en el reactor principal de aproximadamente 350.000 a 400.000 litros y una densidad celular de aproximadamente 0,40 gramos por litro. El tiempo total transcurrido desde la inoculación del primer reactor de crecimiento hasta la inoculación del reactor principal es de 11,7 días.

30 Ejemplo 2: inicio con un reactor de siembra y un reactor de crecimiento

Un fermentador de siembra (aproximadamente 1600 litros) es inoculado con *Clostridium ljungdahlii*. El gas de síntesis fue fermentado hasta que se obtiene una densidad celular de aproximadamente 12 gramos/litro. La mitad del fermentador de siembra (aproximadamente 700 litros) se utiliza para inocular un primer reactor de crecimiento para proporcionar un volumen total en el primer reactor de crecimiento de aproximadamente 2250 litros y una
35 densidad celular de partida de aproximadamente 0,38 gramos por litro. El gas de síntesis se fermenta durante 140 horas desde el tiempo de inoculación para proporcionar una densidad celular de aproximadamente 12 gramos por litro. El cultivo del primer reactor de crecimiento (aproximadamente 11.000 litros) se utiliza para inocular un reactor principal para proporcionar un volumen total en el reactor principal de aproximadamente 350.000 a aproximadamente 400.000 litros y una densidad celular de aproximadamente 0,38 gramos por litro. El tiempo total
40 transcurrido desde la inoculación del primer reactor de crecimiento hasta la inoculación del reactor principal es de 9,2 días.

Aunque que la invención divulgada en la presente memoria ha sido descrita mediante realizaciones específicas, ejemplos y aplicaciones de la misma, diversas modificaciones y variaciones podrían realizarse a la misma por parte de los expertos en el arte sin apartarse del alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones.

45

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la fermentación de gas de síntesis que comprende propagar un cultivo de bacterias acetogénicas efectivo para inocular un reactor principal, donde la propagación incluye,

5 i) inocular un primer cultivo de bacterias acetogénicas en un pre-reactor para proporcionar una densidad celular viable mínima.

ii) cultivar el cultivo de bacterias acetogénicas en el pre-reactor para proporcionar una densidad diana del pre-reactor,

10 (a) en donde, si (la densidad celular diana del pre-reactor multiplicada por el volumen del pre-reactor) ÷ (un volumen del reactor principal multiplicado por (un volumen del pre-reactor ÷ un volumen del pre-reactor que es transferido)) es mayor que o igual a una densidad celular viable mínima, transferir un volumen del pre-reactor al reactor principal en una cantidad efectiva para proporciona una densidad celular viable mínima en el reactor principal, o

15 (b) si (la densidad celular diana del pre-reactor multiplicada por el volumen del pre-reactor) ÷ (un volumen del reactor principal multiplicado por (un volumen del pre-reactor ÷ un volumen del pre-reactor que se transfiere)) es menor que una densidad celular viable mínima, transferir un volumen del pre-reactor a un pre-reactor posterior en una cantidad efectiva para proporcionar una densidad celular viable mínima en un pre-reactor posterior, y

20 iii) repetir el paso ii hasta que se transfiere un volumen del pre-reactor al reactor principal, y en donde se utiliza de un 25% a un 75% del volumen de un pre-reactor para inocular un pre-reactor posterior o reactor principal, a la vez que se mantiene el volumen restante para su uso para una re-inoculación en caso de cualquier fallo posterior del reactor.

2. Proceso según la reivindicación 1 en donde la densidad celular viable es de al menos 0,2 gramos por litro.

3. Proceso según la reivindicación 1 en donde la densidad celular diana del pre-reactor es de al menos 5 gramos por litro.

25 4. Proceso según la reivindicación 1 en donde una relación en volumen del volumen del pre-reactor transferido a un volumen del pre-reactor posterior o un volumen del reactor principal es de 0,02 a 0,5.

5. Proceso según la reivindicación 1 en donde el gas de síntesis presenta una relación molar CO/CO₂ de al menos 0,75.

30 6. Proceso según la reivindicación 1 en donde el primer cultivo presenta un pH de 6,5 o menos y una concentración de ácido acético de 10 gramos por litro o menos.

7. Proceso según la reivindicación 1 en donde el gas de síntesis tiene de un 20 a un 100 % mol de CO.

8. Proceso según la reivindicación 1 en donde el gas de síntesis utilizado para propagar bacterias acetogénicas es sustancialmente CO.

35 9. Proceso según la reivindicación 1 en donde las bacterias acetogénicas se seleccionan del grupo que consiste en *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia produeta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobaeter subterraneus*, *Caldanaerobacter subterraneus pacifiuts*, *Carboxydothermus hydrogenoformans*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acetobutylicum* P262 (DSM 19630 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 19630 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 23693 de DSMZ Alemania), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 24138 de DSMZ Alemania), *Clostridium carboxidivorans* P7 (ATCC PTA-7827), *Clostridium coskatii* (ATCC PTA-10522), *Clostridium drakei*, *Clostridium ljungdahlii* PETC (ATCC 49587), *Clostridium ljungdahlii* ERI2 (ATCC 55380), *Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988), *Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55889), *Clostridium magnum*, *Clostridium pasteurianum* (DSM 525 de DSMZ Alemania), *Clostridium ragsdali* P11 (ATCC BAA-622), *Clostridium scatologenes*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium ultunense*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Eubacterium limosum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Morrella thermoacetica*, *Morrella thermoautotrophiea*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Ruminococcus produetus*, *Thermoanaerobacter kivui*, y mezclas de las mismas.

10. Proceso según la reivindicación 1, en donde la relación en volumen del pre-reactor transferido a un pre-reactor posterior o reactor principal es de 0,02 a 0,5, tal como por ejemplo, 0,02 a 0,2.

FIG. 1

