

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 552**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2014 PCT/US2014/041141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2014 E 14735047 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 3008165**

54 Título: **Control de la conductividad en la fermentación anaerobia**

30 Prioridad:

10.06.2013 US 201361833189 P
02.06.2014 US 201414293089

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.12.2017

73 Titular/es:

INEOS BIO SA (100.0%)
Avenue Des Uttins 3
1180 Rolle, CH

72 Inventor/es:

SENARATNE, RYAN H.;
BELL, PETER SIMPSON;
LIU, SONG y
SCOTT, SYRONA R.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 646 552 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

Control de la conductividad en la fermentación anaerobia

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional en Estados Unidos n.º 61/833 189 que fue presentada el 10 de junio de 2013.

10 Se proporciona un proceso para el control de la conductividad durante la fermentación de un sintegas y el mantenimiento de un STY de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) o superior. Más específicamente, los procesos para controlar la conductividad incluyen equilibrar la conductividad del medio, la captación de carbono específica, o la densidad celular.

Antecedentes

15 Los microorganismos anaerobios pueden producir etanol a partir de CO mediante fermentación de sustratos gaseosos. Las fermentaciones que emplean microorganismos anaerobios del género *Clostridium* producen etanol y otros productos útiles. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5 173 429 describe el *Clostridium ljungdahlii* ATCC n.º 49587, un microorganismo acetogénico que produce etanol y acetato a partir de gas de síntesis. La patente de Estados Unidos n.º 5 807 722 describe un método y un aparato para convertir gases residuales en ácidos orgánicos y alcoholes utilizando *Clostridium ljungdahlii* ATCC n.º 55380. La patente de Estados Unidos n.º 6 136 577 describe un método y un aparato para convertir gases residuales en etanol utilizando *Clostridium ljungdahlii* ATCC n.º 55988 y 55989.

25 Las bacterias acetogénicas requieren una alimentación constante de nutrientes para una productividad de etanol y un rendimiento estable. Niveles de productividad más elevados pueden requerir el uso de medios más concentrados a fin de proporcionar cantidades eficaces de nutrientes. El uso de medios más concentrados da como resultado un caldo de fermentación con una fuerza iónica más elevada. Una fuerza iónica más elevada produce efectos perjudiciales sobre el rendimiento del cultivo.

30 El documento WO 2012/074543 divulga un proceso de producción de un alcohol a partir de un sustrato gaseoso, que comprende la fermentación de un sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono (CO) en un medio acuoso en un biorreactor; comprendiendo dicho proceso un aumento de la densidad celular ajustando la captación de CO específica en dicho medio acuoso. El documento WO 2012/074545 divulga un proceso de producción de un alcohol a partir de un sustrato gaseoso, que comprende la fermentación de un sustrato gaseoso que comprende uno o más de hidrógeno (H₂) y CO en un medio acuoso en un biorreactor; comprendiendo dicho proceso un aumento de la densidad celular ajustando la captación de hidrógeno. El documento WO 02/08438 divulga un método para producir etanol a partir de la fermentación bacteriana anaerobia de un sustrato gaseoso, comprendiendo el método cultivar en un biorreactor de fermentación bacterias anaerobias acetogénicas en un medio nutriente líquido, y suministrar a dicho biorreactor dicho sustrato gaseoso que comprende al menos un gas reductor seleccionado entre el grupo que consiste en CO y H₂; y manipular dichas bacterias en dicho biorreactor disminuyendo el potencial de oxidación-reducción, o aumentando la proporción del NAD(P)H respecto al NAD(P), en el caldo de fermentación una vez que dichas bacterias han conseguido una concentración celular estable en dicho biorreactor, en el que dicha concentración de ácido acético libre en dicho biorreactor es inferior a 5 g/l de ácido libre, causando dichas etapas de cultivo y manipulación que dichas bacterias en dicho biorreactor produzcan etanol en un caldo de fermentación a una productividad superior a 10 g/l por día y en el que se producen tanto etanol como acetato en dicho caldo de fermentación en una relación de etanol a acetato que varía de 1:1 a 20:1.

Sumario

50 Se proporcionan procesos que son eficaces para controlar la conductividad del medio durante la fermentación de un sustrato gaseoso que contiene CO al tiempo que se proporciona un STY de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) o superior. El proceso incluye equilibrar la conductividad del medio, la captación de carbono específica, o los niveles de densidad celular.

55 Un proceso para la fermentación de un sustrato gaseoso que contiene CO incluye proporcionar un sustrato gaseoso que contiene CO a un medio de fermentación y fermentar el sustrato gaseoso que contiene CO poniéndolo en contacto con una o más bacterias acetogénicas; controlando la conductividad del medio durante la fermentación mientras se proporciona un rendimiento de espacio-tiempo (STY) de 10 g de etanol/(l.día) o superior, en el que el medio tiene una conductividad de 30 mS/cm o inferior; y manteniendo una relación entre la conductividad y la captación de carbono específica (SCU en mmoles/minuto/gramo de células secas) de acuerdo con una fórmula en la que $SCU = SCU_{max} - F \cdot \text{conductividad}$, en la que $SCU_{max} =$ hasta 3 y $F =$ de 0,05 a 1. El medio de fermentación tiene una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm o inferior y el proceso es eficaz para mantener un STY de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) o superior. También se describe un proceso para fermentar un sustrato gaseoso que contiene CO que incluye proporcionar un sustrato gaseoso que contiene CO a un medio de fermentación y fermentar el sintegas. El proceso incluye además mantener una conductividad (y) a una velocidad de alimentación del gas específica (x) de acuerdo con la fórmula en la que $y = -6,0327x + 12,901$, hasta alcanzar una

densidad celular deseada, en la que x es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,7 mmoles/minuto/gramo de células. En otro aspecto, el proceso incluye mantener una densidad celular por encima de la densidad celular deseada y mantener una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm o inferior. El proceso es eficaz para mantener un STY de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) o superior. Se describe también un proceso para la fermentación de un sustrato gaseoso que contiene CO que incluye introducir el sustrato gaseoso que contiene CO en un vaso de reactor que incluye un medio de fermentación y fermentar el sustrato gaseoso que contiene CO. En un aspecto del proceso, al menos uno o más iones cloruro del medio de fermentación están sustituidos por un ion seleccionado entre el grupo que consiste en hidróxido, acetato, carbonato, bicarbonato y mezclas de los mismos en una cantidad eficaz para proporcionar una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm o inferior. El proceso es eficaz para mantener un STY de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) o superior.

Breve descripción de las figuras

El anterior y otros aspectos, características y ventajas de diversos aspectos del proceso serán más evidentes a partir de las figuras siguientes.

La figura 2 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación de sintegas de 35 ml/min.

La figura 3 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación de sintegas de 40 ml/min.

La figura 4 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación de sintegas de 45 ml/min.

La figura 5 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación de sintegas de 50 ml/min.

La figura 6 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación de sintegas de 50 ml/min con un inóculo inicial mayor.

La figura 7 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación de sintegas de 45 ml/min con un inóculo inicial mayor.

La figura 8 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación de sintegas de 35 ml/min con un inóculo inicial mayor.

La figura 9 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación de sintegas de 30 ml/min con un inóculo inicial mayor.

La figura 10 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación de sintegas de 20 ml/min con un inóculo inicial mayor.

La figura 11 muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene cloruro de amonio.

La figura 12 muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene cloruro de amonio.

La figura 13 ilustra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene 1-lisina.

La figura 14 ilustra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene 1-lisina.

La figura 15 muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene 1-lisina.

La figura 16 muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene acetato de amonio.

La figura 17 ilustra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene acetato de amonio.

La figura 18 ilustra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene acetato de amonio.

La figura 19 muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio.

La figura 20 muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio.

La figura 21 ilustra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio.

La figura 22 ilustra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con carbonato de amonio como base.

La figura 23 muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con carbonato de amonio como base.

La figura 24 muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con carbonato de amonio como base.

En la figura 25 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con bicarbonato de amonio.

En la figura 26 se muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con bicarbonato de amonio.

En la figura 27 se muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con bicarbonato de amonio.

La figura 28 ilustra los efectos de un aumento progresivo de la conductividad del medio sobre el rendimiento de *Clostridium ljungdahlii*.

La figura 29 ilustra los efectos de un aumento progresivo de la conductividad del medio sobre el rendimiento de *Clostridium ljungdahlii*.

La figura 30 muestra la relación entre la velocidad de alimentación de CO específica y la conductividad durante la fermentación de *Clostridium ljungdahlii*.

La figura 31 muestra la relación entre la captación de carbono específica y la conductividad durante la fermentación de *Clostridium ljungdahlii*.

Caracteres de referencia correspondientes indican componentes correspondientes a lo largo de todas las diversas vistas de las figuras. Los expertos en la materia apreciarán que los elementos en las figuras se ilustran con fines de simplicidad y claridad y no están dibujados necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos en las figuras se pueden exagerar en relación con otros elementos para ayudar a mejorar la comprensión de diversos aspectos del presente proceso y aparato. Además, los elementos comunes pero bien entendidos que son útiles o necesarios en aspectos comercialmente factibles no son representados frecuentemente con el fin de facilitar una vista menos obstruida de estos diversos aspectos.

Descripción detallada

La siguiente descripción no se ha de tomar en un sentido limitante, sino que se ha realizado simplemente con el fin de describir los principios generales de realizaciones ilustrativas. El alcance de la invención se debe determinar con referencia a las reivindicaciones.

Las fermentaciones del sintegas efectuadas en biorreactores con un medio y bacterias acetogénicas tal como se describe en el presente documento son eficaces para proporcionar conversiones del CO del sintegas en alcoholes y otros productos. El control de la conductividad, la conductividad, y la densidad celular son eficaces para proporcionar altos niveles de productividad. En este aspecto, la productividad de alcohol se puede expresar como el STY (rendimiento de espacio-tiempo expresado en g de etanol/(l.día)). En este aspecto, el proceso es eficaz para proporcionar un STY (rendimiento de espacio-tiempo) de al menos aproximadamente 10 g de etanol/(l.día). Valores posibles de STY incluyen de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 200 g de etanol/(l.día), en otro aspecto de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 160 g de etanol/(l.día), en otro aspecto de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 120 g de etanol/(l.día), en otro aspecto de aproximadamente 10 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 80 g de etanol/(l.día), en otro aspecto de aproximadamente 20 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 140 g de etanol/(l.día), en otro aspecto de aproximadamente 20 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 100 g de etanol/(l.día), en otro aspecto de aproximadamente 40 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 140 g de etanol/(l.día), y en otro aspecto de aproximadamente 40 g de etanol/(l.día) a aproximadamente 100 g de etanol/(l.día).

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los siguientes términos tal como se usan a lo largo de la presente memoria descriptiva de la presente divulgación se definen como sigue a continuación y pueden incluir tanto formas en singular como en plural de las definiciones dadas a continuación:

El término "aproximadamente" que modifica cualquier cantidad hace referencia a la variación en la que esa cantidad se encuentra en las condiciones del mundo real, por ejemplo, en el laboratorio, planta piloto, o instalación de producción. Por ejemplo, una cantidad de un ingrediente o una medición empleadas en una mezcla o cantidad, cuando es modificada por "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 modificada 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. Modificadas o no por el término "aproximadamente", las cantidades incluyen equivalentes a esas cantidades. Cualquier cantidad establecida en el presente documento y modificada por "aproximadamente" se puede emplear también en la presente divulgación como la cantidad no modificada por "aproximadamente".

"Conductividad" y "conductividad promedio" se refieren a la capacidad para conducir la electricidad. El agua conduce la electricidad ya que contiene sólidos disueltos que portan cargas eléctricas. Por ejemplo, los iones cloruro, nitrato y sulfato portan cargas negativas, mientras que los iones sodio, magnesio y calcio portan cargas positivas. Estos sólidos disueltos influyen en la capacidad del agua para conducir la electricidad. La conductividad se mide mediante una sonda, la cual aplica un potencial entre dos electrodos. La caída de potencial se usa para medir la resistencia del agua, la cual se convierte después en conductividad. La conductividad promedio se puede medir mediante técnicas y métodos conocidos. Algunos ejemplos de mediciones de conductividad promedio se proporcionan en la norma ASTM D1125, "Métodos de prueba estándar para la conductividad y la resistividad eléctrica del agua", y en

- 5 "Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales", 1999, Asociación Americana de Salud Pública, Asociación Americana de Obras de Agua, Federación Ambiental del Agua. El término "sintegas" o "gas de síntesis" hace referencia al gas de síntesis que es el nombre dado a una mezcla de gases que contiene cantidades variables 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, en algunos tipos de instalaciones, la gasificación con recuperación de energía. El nombre proviene de su uso como intermedios en la generación de gas natural sintético (SNG) y en la producción de amoníaco o metanol. El sintegas es combustible y se usa a menudo como fuente de combustible o como intermedio para la producción de otros productos químicos.
- 10 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 en alcohol.
- 15 El término "densidad celular" se refiere a la masa de células de microorganismo por unidad de volumen de caldo de fermentación, por ejemplo, gramos/litro. En este aspecto, el proceso y los medios son eficaces para proporcionar una densidad celular de al menos aproximadamente 1,0 g/l.
- 20 El término "reciclaje celular" se refiere a la separación de las células microbianas de un caldo de fermentación y al retorno de todas o parte de estas células microbianas separadas de nuevo al fermentador. De modo general, se usa un dispositivo de filtración para conseguir las separaciones.
- 25 El término "fermentador", "vaso del reactor" o "biorreactor", incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías, que incluye el reactor continuo de tanque agitado (CSTR), el reactor de células inmovilizadas (ICR), el reactor de lecho percolador (TBR), el reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR), la columna de burbujeo, el fermentador de agitación por gas, un reactor de membrana tal como el biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR), mezclador estático, u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido.
- 30 Sustrato que contiene CO
- Un sustrato que contiene CO puede incluir cualquier gas que incluya CO. En este aspecto, un gas que contiene CO puede incluir sintegas, gases industriales, y mezclas de los mismos.
- 35 El sintegas puede ser proporcionado a partir de cualquier fuente. En un aspecto, el sintegas se puede obtener de la gasificación de materiales carbonosos. La gasificación implica la combustión parcial de biomasa con un suministro restringido de oxígeno. El gas resultante incluye principalmente CO y H₂. En este aspecto, el sintegas contendrá al menos aproximadamente un 10 % molar de CO, en un aspecto al menos aproximadamente un 20 % molar, en un aspecto de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 100 % molar, en otro aspecto de aproximadamente un 20 a aproximadamente un 100 % molar de CO, en otro aspecto de aproximadamente un 30 a aproximadamente un 90 % molar, en otro aspecto de aproximadamente un 40 a aproximadamente un 80 % molar de CO, y en otro aspecto de aproximadamente un 50 a aproximadamente un 70 % molar de CO. Algunos ejemplos de métodos y aparatos de gasificación adecuados se proporcionan en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.^{os} de serie 61/516 667, 61/516 704 y 61/516 646, todas ellas presentadas el 6 de abril de 2011, y en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.^{os} de serie 13/427 144, 13/427 193 y 13/427 247, todas ellas presentadas el 22 de marzo de 2012. En otro aspecto, el proceso tiene aplicabilidad para soportar la producción de alcohol a partir de sustratos gaseosos tales como gases de combustión industriales de elevado volumen que contienen CO. En algunos aspectos, un gas que incluye CO procede de residuos que contienen carbono, por ejemplo gases residuales industriales, o de la gasificación de otros residuos. Como tales, los procesos representan procesos eficaces para capturar carbono que de otro modo hubiera sido expulsado al ambiente. Ejemplos de gases de combustión industriales incluyen gases producidos durante la fabricación de productos metálicos férricos, la fabricación de productos no férricos, procesos de refinado del petróleo, la gasificación de carbón, la gasificación de biomasa, la producción de energía eléctrica, la producción de negro de carbón, la producción de amoníaco, la producción de metanol y la fabricación de coque.
- 50 Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO, el sustrato que contiene CO se puede suministrar directamente a un proceso de fermentación o se puede modificar adicionalmente para incluir una relación molar de H₂ respecto al CO adecuada. En un aspecto, el sustrato que contiene CO suministrado al fermentador tiene una relación molar de H₂ respecto al CO de aproximadamente 0,2 o superior, en otro aspecto de aproximadamente 0,25 o superior y, en otro aspecto, de aproximadamente 0,5 o superior. En un aspecto, el sustrato que contiene CO suministrado al fermentador puede incluir aproximadamente un 40 por ciento molar o superior de CO más H₂ y aproximadamente un 30 por ciento molar o inferior de CO, en otro aspecto, aproximadamente un 50 por ciento molar o superior de CO más H₂ y aproximadamente un 35 por ciento molar o inferior de CO, y en otro aspecto aproximadamente un 80 por ciento molar o superior de CO más H₂ y aproximadamente un 20 por ciento molar o inferior de CO.
- 65

5 En un aspecto, el sustrato que contiene CO incluye principalmente CO y H₂. En este aspecto, el sustrato que contiene CO contendrá al menos aproximadamente un 10 % molar de CO, en un aspecto al menos aproximadamente un 20 % molar, en un aspecto de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 100 % molar, en otro aspecto de aproximadamente un 20 a aproximadamente un 100 % molar de CO, en otro aspecto de aproximadamente un 30 a aproximadamente un 90 % molar de CO, en otro aspecto de aproximadamente un 40 a aproximadamente un 80 % molar de CO, y en otro aspecto de aproximadamente un 50 a aproximadamente un 70 % molar de CO. El sustrato que contiene CO tendrá una relación CO/CO₂ de al menos aproximadamente 0,75, en otro aspecto, de al menos aproximadamente 1,0 y, en otro aspecto, de al menos aproximadamente 1,5.

10 En un aspecto, se configura un separador de gases para separar sustancialmente al menos una porción de la corriente de gas, en el que la porción incluye uno o más componentes. Por ejemplo, el separador de gas puede separar CO₂ de una corriente de gas que comprende los siguientes componentes: CO, CO₂, H₂, en el que el CO₂ se puede hacer pasar a través de un eliminador de CO₂ y el resto de la corriente de gas (que comprende CO y H₂) se puede hacer pasar a un biorreactor. Se puede usar cualquier separador de gases conocido en la técnica. En este aspecto, el sintegas suministrado al fermentador tendrá aproximadamente un 10 % molar o inferior de CO₂, en otro aspecto aproximadamente un 1 % molar o inferior de CO₂, y en otro aspecto aproximadamente un 0,1 % molar o inferior de CO₂.

20 Determinadas corrientes de gas pueden incluir una alta concentración de CO y bajas concentraciones de H₂. En un aspecto, puede ser deseable optimizar la composición de la corriente de sustrato a fin de conseguir una mayor eficacia de la producción del alcohol y/o de la captura de carbono global. Por ejemplo, la concentración de H₂ en la corriente de sustrato se puede incrementar antes de hacer pasar la corriente al biorreactor.

25 De acuerdo con aspectos particulares de la invención, se pueden combinar y/o mezclar corrientes de dos o más fuentes para producir una corriente de sustrato deseable y/u optimizada. Por ejemplo, una corriente que comprende una alta concentración de CO, tal como el gas procedente de un convertidor de una acería, se puede combinar con una corriente que comprende altas concentraciones de H₂, tal como el gas de escape procedente de un horno de coque de una acería.

30 Dependiendo de la composición del sustrato gaseoso que contiene CO, puede ser deseable también tratar este a fin de eliminar cualquier impureza indeseada, tal como partículas de polvo, antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso se puede filtrar o limpiar usando métodos conocidos.

35 Diseño del biorreactor y operación

Descripciones de los diseños del fermentador se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.^{os} de serie 13/471 827 y 13/471 858, presentadas ambas el 15 de mayo de 2012, y la solicitud de patente de Estados Unidos con n.^o de serie 13/473 167, presentada el 16 de mayo de 2012. De acuerdo con un aspecto, el proceso de fermentación se inicia mediante la adición de medio al vaso del reactor. Algunos ejemplos de composiciones de medio se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.^{os} de serie 61/650 098 y 61/650 093, presentadas el 22 de mayo de 2012, y en la patente de Estados Unidos n.^o 7 285 402, presentada el 23 de julio de 2001. El medio se puede esterilizar para eliminar microorganismos indeseables y el reactor se inocula con los microorganismos deseados. La esterilización no siempre es necesaria.

45 En un aspecto, los microorganismos usados incluyen bacterias acetogénicas. Ejemplos de bacterias acetogénicas útiles incluyen las del género *Clostridium*, tales como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo las descritas en los documentos WO 2000/68407 y EP 117309, las patentes de Estados Unidos n.^{os} 5 173 429, 5 593 886 y 6 368 819, y los documentos WO 1998/00558 y WO 2002/08438, cepas de *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061 y DSM 19630 de DSMZ, Alemania) incluyendo las descritas en los documentos WO 2007/117157 y WO 2009/151342 y *Clostridium ragsdalei* (P11, ATCC BAA-622) y *Alkalibaculum bacchi* (CP11, ATCC BAA-1772) incluyendo las descritas respectivamente en la patente de Estados Unidos n.^o 7 704 723 y en "Biofuels and Bioproducts from Biomass-Generated Synthesis Gas", Hasan Atiyeh, presentado en la Conferencia estatal anual EPSCoR de Oklahoma, el 29 de abril de 2010, y *Clostridium carboxidivorans* (ATCC PTA-7827) descrita en la solicitud de patente en Estados Unidos n.^o 2007/0276447. Otros microorganismos adecuados incluyen los del género *Moorella*, incluyendo *Moorella sp.* HUC22-1, y los del género *Carboxydotherraus*. Se pueden emplear cultivos mezclados de dos o más microorganismos.

60 Algunos ejemplos de bacterias útiles incluyen *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobium noteroae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldaranaerobacter subterraneus pacificus*, *Carboxydotherraus hydrogeniformans*, *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 thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Ruminococcus productus*, *Thermoanaerobacter kivui*, y mezclas de las mismas.

La fermentación se debe llevar a cabo adecuadamente en las condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación deseada (por ejemplo, de CO a etanol). Las condiciones de reacción que se han de tener en cuenta incluyen, presión, temperatura, caudal del gas, caudal del líquido, pH del medio, potencial de oxidación-reducción del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor continuo de tanque agitado), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato gaseoso para asegurar que el CO en la fase líquida no llega a ser limitante y concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición por el producto.

Los métodos de la invención y tal como se divulgan se pueden usar para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano, en los que el cultivo microbiano está limitado en CO de modo que la velocidad de transferencia de CO a la solución sea menor que la velocidad de captación del cultivo. Tales situaciones se producen cuando un sustrato que comprende CO no se suministra de forma continua al cultivo microbiano; la velocidad de transferencia de masa es baja; o hay insuficiente CO en una corriente de sustrato para mantener la vitalidad del cultivo a una temperatura óptima. En tales realizaciones, el cultivo microbiano agotará rápidamente el CO disuelto en el medio nutriente líquido y llegará a estar limitado por el sustrato ya que no se puede suministrar sustrato adicional con suficiente rapidez.

Puesta en marcha: Tras la inoculación, se establece una velocidad de suministro de gas de alimentación inicial que es eficaz para suministrar a la población inicial de microorganismos. El gas efluente se analiza para determinar el contenido del gas efluente. Los resultados del análisis del gas se usan para controlar las velocidades del gas de alimentación. En este aspecto, el proceso puede proporcionar una concentración de CO calculada con respecto a la relación de densidad celular inicial de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,9, en otro aspecto de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,8, en otro aspecto de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,7, y en otro aspecto de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,6.

En otro aspecto, un proceso de fermentación incluye proporcionar un sintegas a un medio de fermentación en una cantidad eficaz para proporcionar una concentración de CO inicial calculada en el medio de fermentación de aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,70 mM, en otro aspecto de aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,50 mM, en otro aspecto de aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,35 mM, en otro aspecto de aproximadamente 0,20 mM a aproximadamente 0,30 mM, y en otro aspecto de aproximadamente 0,23 mM a aproximadamente 0,27 mM. El proceso es eficaz para aumentar la densidad celular en comparación con una densidad celular de partida.

En un aspecto, un proceso para fermentar un sustrato gaseoso que contiene CO incluye suministrar un sustrato gaseoso que contiene CO a un medio de fermentación y mantener una conductividad con respecto a una captación de carbono específica (SCU en mmoles/minuto/gramo de células secas) de acuerdo con una fórmula en la que $SCU = SCU_{max} - F \cdot \text{conductividad}$, en la que SCU_{max} = de 0 a 3 y F = de 0 a 1. La figura 31 ilustra gráficamente esta ecuación. En este aspecto, el medio de fermentación tiene una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm o inferior, y en otros aspectos puede tener la conductividad tal como se describe en el presente documento. En otro aspecto, F (que es la pendiente de la recta) puede ser de 0 a 1, en otro aspecto de 0,05 a 1, en otro aspecto de 0,1 a 1, en otro aspecto de 0,2 a 1, en otro aspecto de 0,3 a 1, en otro aspecto de 0,4 a 1, y en otro aspecto de 0,5 a 1.

En un aspecto, el proceso incluye mantener una conductividad (y) a una velocidad de alimentación del gas (x) específica de acuerdo con la fórmula $y = -10,109x + 14,2$, hasta alcanzar una densidad celular deseada. La figura 30 ilustra gráficamente esta ecuación. En este aspecto, el medio de fermentación tiene una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm o inferior, y en otros aspectos puede tener la conductividad tal como se describe en el presente documento. En este aspecto, x es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,7 mmoles/minuto/gramo de células. En otro aspecto, x es de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,6 mmoles/minuto/gramo de células, y en otro aspecto x es de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5 mmoles/minuto/gramo de células.

En otro aspecto, el proceso es eficaz para proporcionar una densidad celular deseada de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 g/l, en otro aspecto de aproximadamente 4 a aproximadamente 25 g/l, en otro aspecto de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 g/l, en otro aspecto de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 g/l, en otro aspecto de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 g/l, en otro aspecto de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 g/l, y en otro aspecto de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 g/l.

Tras la puesta en marcha: Tras alcanzar los niveles deseados, la fase líquida y el material celular se retiran del reactor y se reabastecen de medio. El proceso es eficaz para aumentar la densidad celular a aproximadamente 2,0 gramos/litro o superior, en otro aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 gramos/litro, en otro aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 gramos/litro, en otro aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 gramos/litro, en otro aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 gramos/litro, en

otro aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 gramos/litro, en otro aspecto de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 gramos/litro, en otro aspecto de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 gramos/litro, en otro aspecto de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 gramos/litro.

5 Tras alcanzar la densidad celular deseada, el proceso es eficaz para mantener una densidad celular. La densidad celular se puede mantener a lo largo de todo el reciclaje celular. El proceso puede usar el reciclaje celular para aumentar o disminuir la concentración celular dentro del reactor. En este aspecto, el efluente líquido del reactor se envía a un separador celular en el que las células son permeadas y separadas. Las células se pueden retornar de nuevo al reactor. La densidad celular se puede controlar mediante un filtro de reciclaje. Algunos ejemplos de
 10 biorreactores y de reciclaje celular se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.º de serie 61/571 654 y 61/571 565 presentadas el 30 de junio de 2011, la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 61/573 845, presentada el 13 de septiembre de 2011, las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.º de serie 13/471 827 y 13/471 858, presentadas el 15 de mayo de 2012, y la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 13/473 167, presentada el 16 de mayo de 2012. En un aspecto, el proceso es eficaz para mantener una
 15 conversión de H₂ de aproximadamente un 25 % o superior. En otro aspecto, el proceso es eficaz para mantener una conversión de H₂ en de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 95 %, en otro aspecto de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 90 %, en otro aspecto de aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 85 %, en otro aspecto de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 80 %, en otro aspecto de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 70 %, en otro aspecto de aproximadamente un 40 %
 20 a aproximadamente un 60 %, y en otro aspecto de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 50 %.

En otro aspecto, el proceso es eficaz para mantener una captación de CO en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mmoles/minuto/gramo de células secas. En otro aspecto, el proceso es eficaz para
 25 mantener una captación de CO en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 4 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 3 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 2 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 9
 30 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 4 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1
 35 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 mmoles/minuto/gramo de células secas, en otro aspecto de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mmoles/minuto/gramo de células secas, y en otro aspecto de aproximadamente 1 a aproximadamente 2
 40 mmoles/minuto/gramo de células secas.

En otro aspecto, el proceso es eficaz para proporcionar una conversión de CO de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 99 %. En otro aspecto, la conversión de CO en de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 90 %, en otro aspecto de aproximadamente un 20 a aproximadamente un 80 %, en otro
 45 aspecto de aproximadamente un 30 a aproximadamente un 70 %, en otro aspecto de aproximadamente un 40 a aproximadamente un 60 %, en otro aspecto de aproximadamente un 50 a aproximadamente un 95 %, en otro aspecto de aproximadamente un 60 a aproximadamente un 95 %, en otro aspecto de aproximadamente un 70 a aproximadamente un 95 %, y en otro aspecto de aproximadamente un 80 a aproximadamente un 95 %.

50 Control de la conductividad del medio

El uso de medios formulados para tener una menor conductividad y/o el ajuste de la conductividad del medio mediante dilución son eficaces para controlar la conductividad del medio. En un aspecto, el proceso es eficaz para
 55 proporcionar una conductividad promedio de aproximadamente 30 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 25 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 20 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 16 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 12 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 8 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 6,5 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 6,0 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 5,5 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 5,0 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 4,7 mS/cm o inferior, en otro
 60 aspecto de aproximadamente 4,5 mS/cm o inferior, en otro aspecto de aproximadamente 4,0 mS/cm a aproximadamente 6,5 mS/cm, en otro aspecto de aproximadamente 5,0 mS/cm a aproximadamente 6,0 mS/cm, y en otro aspecto de aproximadamente 4,0 mS/cm a aproximadamente 5,0 mS/cm.

De acuerdo con un aspecto, el proceso de fermentación se inicia mediante la adición de un medio adecuado al vaso
 65 del reactor. El líquido contenido en el vaso del reactor puede incluir cualquier tipo de medio nutriente o medio de fermentación adecuado. El medio nutriente incluirá vitaminas y minerales eficaces para permitir el crecimiento del

microorganismo que se esté usando. Es conocido un medio anaerobio adecuado para la fermentación de etanol que usa CO como fuente de carbono. Un ejemplo de un medio de fermentación adecuado se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7 285 402. Otros ejemplos de medios adecuados se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.ºs de serie 61/650 098 y 61/650 093 presentadas ambas el 22 de mayo de 2012. En un aspecto, el medio usado incluye menos de aproximadamente 0,01 g/l de extracto de levadura y menos de aproximadamente 0,01 g/l de carbohidratos.

Sustitución de iones cloruro: En un aspecto, el proceso proporciona medios que tienen una conductividad promedio inferior a aproximadamente 30 mS/cm mediante la sustitución de iones cloruro en el medio por iones distintos a cloruro. Más específicamente, se puede sustituir el cloruro de amonio por una fuente de nitrógeno seleccionada entre el grupo que consiste en hidróxido de amonio, acetato de amonio, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio y mezclas de los mismos.

En un aspecto, el medio incluye al menos una o más fuentes de nitrógeno, al menos una o más fuentes de fósforo y al menos una o más fuentes de potasio. El medio puede incluir una cualquiera de las tres, cualquier combinación de las tres y, en un aspecto importante, incluye las tres. Una fuente de fósforo puede incluir una fuente de fósforo seleccionada entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, fosfato de amonio, fosfato de potasio, y mezclas de los mismos. Una fuente de potasio puede incluir una fuente de potasio seleccionada entre el grupo que consiste en cloruro de potasio, fosfato de potasio, nitrato de potasio, sulfato de potasio, y mezclas de los mismos.

En un aspecto, el medio incluye uno o más de los siguientes: hierro, tungsteno, níquel, cobalto, magnesio, azufre y tiamina. El medio puede incluir uno cualquiera de estos componentes, cualquier combinación y, en un aspecto importante, incluye todos estos componentes. Una fuente de hierro puede incluir una fuente de hierro seleccionada entre el grupo que consiste en cloruro ferroso, sulfato ferroso, y mezclas de los mismos. Una fuente de tungsteno puede incluir una fuente de tungsteno seleccionada entre el grupo que consiste en tungstenato de sodio, tungstenato de calcio, tungstenato de potasio, y mezclas de los mismos. Una fuente de níquel puede incluir una fuente de níquel seleccionada entre el grupo que consiste en cloruro de níquel, sulfato de níquel, nitrato de níquel, y mezclas de los mismos. Una fuente de cobalto puede incluir una fuente de cobalto seleccionada entre el grupo que consiste en cloruro de cobalto, fluoruro de cobalto, bromuro de cobalto, yoduro de cobalto y mezclas de los mismos. Una fuente de magnesio puede incluir una fuente de magnesio seleccionada entre el grupo que consiste en cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de magnesio y mezclas de los mismos. Una fuente de azufre puede incluir cisteína, sulfuro de sodio y mezclas de los mismos.

Las concentraciones de los diversos componentes son las siguientes:

Componente	Intervalo de concentración (expresado como mg o µg de nutriente por gramo de células)	Intervalo preferido (expresado como mg o µg de nutriente por gramo de células)
nitrógeno (N)	100 - 340 mg	190 - 210 mg
fósforo (P)	10,5 - 15 mg	12 - 13 mg
potasio (K)	26 - 36 mg	28 - 33 mg
hierro (Fe)	2,7 - 5 mg	3,0 - 4,0 mg
tungsteno (W)	10 - 30 µg	15 - 25 µg
níquel (Ni)	34 - 40 µg	35 - 37 µg
cobalto (Co)	9 - 30 µg	15 - 20 µg
magnesio (Mg)	4,5 - 10 mg	5 - 7 mg
azufre (S)	11 - 20 mg	12 - 16 mg
tiamina	6,5 - 20 µg	7 - 12 µg

La operación del proceso mantiene el pH en un intervalo de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 4,8. El medio usado incluye menos de aproximadamente 0,01 g/l de extracto de levadura y menos de aproximadamente 0,01 g/l de carbohidratos.

En otro aspecto, el proceso controla la conductividad del medio mediante la dilución del medio. En este aspecto, una vez que la fermentación alcanza una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm, el proceso incluye la adición de agua o de un medio de baja conductividad a la fermentación en una cantidad eficaz para disminuir la conductividad del medio.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de la conductividad sobre el cultivo

5 Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* en un biorreactor (New Brunswick BioFlo I o IIc). Se efectuaron los siguientes ajustes:

10 Se ajustó la conductividad del cultivo ajustando la fuerza del medio de cultivo, por ejemplo la concentración de todos los componentes, excepto la vitamina, en el medio de cultivo en 1,5 veces a fin de incrementar la conductividad del cultivo de aproximadamente 7 mS a aproximadamente 9,5 mS.

Todos los experimentos se iniciaron con la densidad celular inicial de 0,38 (+/-0,02) o 0,48 g/l.

15 El caudal de gas inicial de cada experimento se mantuvo invariable a lo largo del experimento. Se usaron los parámetros del reactor, cuando los valores de conversión de CO alcanzan un nivel estable tras una puesta en marcha con éxito, a fin de calcular el K_{La} para condiciones relevantes.

La composición del sintegas era de un 30 % de CO, un 15 % de H₂, un 10 % de CO₂ y un 45 % de N₂.

20 Operación # 1 del biorreactor: se usó en este experimento medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación del sintegas de 25 ml/min. Tras un periodo de desfase inicial de aproximadamente 20 horas las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,22 mmol en el caldo del reactor.

25 Operación # 2 del biorreactor: Se usó en este experimento medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación del sintegas de 35 ml/min. Tal como se muestra en la figura 2, tras un periodo de desfase inicial de aproximadamente 36 horas las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,22 mmol en el caldo del reactor.

30 (D CO: concentración de CO disuelto en el caldo del reactor, CD: densidad celular, SCU: captación de CO específica)

Operación # 3 del biorreactor: Se usó en este experimento medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación del sintegas de 40 ml/min. Tal como se muestra en la figura 3, tras un periodo de desfase inicial de aproximadamente 45 horas las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas.

35 El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,22 mmol en el caldo del reactor.

Operación # 4 del biorreactor: Se usó en este experimento medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación del sintegas de 45 ml/min. Tal como se muestra en la figura 4, tras un periodo de desfase inicial de aproximadamente 50 horas las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,17 mmol en el caldo del reactor.

40 Operación # 5 del biorreactor: Se usó en este experimento medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación del sintegas de 50 ml/min. Tal como se muestra en la figura 5, el cultivo continuó en desfase incluso a aproximadamente 70 horas después de la inoculación. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,23 mmol en el caldo del reactor.

45 Operación # 6 del biorreactor: Se usó en este experimento medio de cultivo x 1 y una velocidad de alimentación del sintegas de 50 ml/min. El experimento se inició con un inóculo de 4,8 g/l de bacterias. Tal como se muestra en la figura 6, tras un periodo de desfase inicial de aproximadamente 10 horas las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,12 mmol en el caldo del reactor.

50 Operación # 7 del biorreactor: Se usó en este experimento medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación del sintegas de 45 ml/min. El experimento se inició con un inóculo de 3,8 g/l de bacterias. Tal como se muestra en la figura 7, la densidad celular de las bacterias disminuía con el tiempo. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,25 mmol en el caldo del reactor.

55 Operación # 8 del biorreactor: se usó en este experimento medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación del sintegas de 35 ml/min. El experimento se inició con un inóculo de 3,8 g/l de bacterias. Tal como se muestra en la figura 8, la densidad celular de las bacterias disminuía con el tiempo. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,22 mmol en el caldo del reactor.

60 Operación # 9 del biorreactor: se usó en este experimento medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación del sintegas de 30 ml/min. El experimento se inició con un inóculo de 3,8 g/l de bacterias. Tal como se muestra en la figura 9, la densidad celular de las bacterias disminuía con el tiempo. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,22 mmol en el caldo del reactor.

65 Operación # 10 del biorreactor: se usó en este experimento medio de cultivo x 1,5 y una velocidad de alimentación del sintegas de 20 ml/min. El experimento se inició con un inóculo de 3,8 g/l de bacterias. Tal como se muestra en la figura 10, la densidad celular de las bacterias aumentaba con el tiempo y conseguía un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado era de aproximadamente 0,22 mmol en el caldo del reactor.

Ejemplo 2: Cultivo en fuentes de nitrógeno alternativas

Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* C-01 en un biorreactor (BioFlo/CelliGen 115) con el medio siguiente:

5

Producto químico	Límite
FeCl ₂ *4H ₂ O (g)	0,24
H ₃ PO ₄ (ml)	0,86
KCl (g)	3,00
MgCl ₂ *6H ₂ O (g)	0,48
NH ₄ Cl (g)	19,44
Cisteína HCl (g)	4,50
6 x Med A2 (ml)	15,0
6 x TE (ml)	4,6
Agua (l)	hasta 10

Para cada experimento, se excluyó el NH₄Cl del medio y se sustituyó por equivalentes molares de uno de los compuestos que contienen nitrógeno que se describen a continuación.

Producto químico	Límite (g)
1-lisina	26,57
Acetato de amonio NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	28,01
Carbonato de amonio (NH ₄) ₂ CO ₃	17,46
Bicarbonato de amonio (NH ₄)HCO ₃	28,73

10

El pH de estos medios se ajustó hasta ~ 4,0 - 4,4. Se ensayó también carbonato de amonio como solución de base usando concentraciones de 0,25 M (24,02 g/l) y de 0,125 M (12,01 g/l) como sustituto del 7,7 % de NaHCO₃.

15

En la figura 11 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene cloruro de amonio.

En la figura 12 se muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene cloruro de amonio.

20

En la figura 13 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene 1-lisina.

En la figura 14 se muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene 1-lisina.

25

En la figura 15 se muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene 1-lisina.

En la figura 16 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene acetato de amonio.

30

En la figura 17 se muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene acetato de amonio.

En la figura 18 se muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene acetato de amonio.

35

En la figura 19 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio.

40

En la figura 20 se muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio.

En la figura 21 se muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio.

5 En la figura 22 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio como base.

En la figura 23 se muestra la productividad de etanol específica de CL creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio como base.

10 En la figura 24 se muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio que contiene carbonato de amonio como base.

En la figura 25 se muestra la captación de carbono específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con bicarbonato de amonio.

15 En la figura 26 se muestra la productividad de etanol específica de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con bicarbonato de amonio.

20 En la figura 27 se muestra la conductividad de *Clostridium ljungdahlii* creciendo en un medio con bicarbonato de amonio.

Las tablas siguientes resumen los resultados.

25 Captación de carbono específica y Productividad de etanol específica

Tratamiento	SCU promedio	SCU d.t.	Productividad de etanol específica promedio
Valor de referencia	0,711	0,054	5,706
1-lisina (medio)	0,521	0,179	6,421
Acetato de amonio (medio)	0,792	0,082	7,862
Carbonato de amonio (medio)	0,846	0,075	9,009
Carbonato de amonio (base) Total	0,883	0,039	9,718
0,25 M	0,867	0,034	9,091
0,125 M	0,894	0,038	10,165
Bicarbonato de amonio (medio)	0,848	0,047	8,726

Conductividad del medio del fermentador (mS/cm)

Tratamiento	Disminución del valor bruto de la conductividad*	Conductividad promedio
1-lisina (medio)	-5,77	3,291
Acetato de amonio (medio)	-4,75	4,027
Carbonato de amonio (medio)	-3,74	4,839
Carbonato de amonio (base) Total	-6,30	2,445
0,25 M	-5,73	3,065
0,125 M	-6,30	1,982
Bicarbonato de amonio (medio)	-4,05**	4,300

*Usa el valor inicial del experimento de la lisina (8,07 mS/cm) como valor de referencia.

**Omite las mediciones periféricas próximas al inicio del experimento

30

Concentración de ion amonio

Tratamiento	Concentración de ion amonio (ppm) promedio
Valor inicial	145,71
Carbonato de amonio (0,25 M base)	235,26
Carbonato de amonio (0,125 M base)	220,11
Bicarbonato de amonio (medio)	184,41

Los resultados indican que los compuestos nitrogenados, especialmente los que contienen iones amonio, se pueden usar como sustitutos del cloruro de amonio. La L-lisina usada en el medio no dio buenos resultados como fuente de nitrógeno para obtener un alto rendimiento. El uso de lisina llevó a un aumento inicial tanto de la captación de carbono específica (SCU) como de la productividad de etanol específica (SEP), aunque finalmente condujo a unas marcadas disminuciones en ambas métricas. El valor bruto de la SCU disminuyó en un 58 %, mientras que el valor bruto de la SEP disminuyó en un 47 %. La SCU promedio disminuyó en un 26 %, un cambio significativo. La SEP promedio aumentó en un 12 %, pero este aumento no fue estadísticamente significativo debido a una desviación típica muy elevada. La densidad celular disminuyó a lo largo del experimento de 2,03 g/l a 1,02 g/l. El valor bruto de la conductividad disminuyó en un 71 %, de 8,07 mS/cm a 2,30 mS/cm, con un promedio a lo largo del tiempo del experimento de 3,291 mS/cm. La mayor parte del tiempo en este experimento, la conductividad fue inferior a 3,0 mS/cm.

El acetato de amonio como fuente de nitrógeno en el medio condujo a un ligero aumento de solo un 11 % de la SCU promedio, un valor que no es estadísticamente significativo. Sin embargo, el valor bruto para la SCU disminuyó desde el principio hasta el final del experimento (0,943 vs. 0,830), una caída del 12 %. Hubo un aumento significativo del 37 % de la SEP promedio en comparación con los promedios de referencia. El valor bruto de la SEP aumentó durante el experimento de 6,43 a 8,57, un incremento del 25 %. La conductividad durante este experimento disminuyó en un 58 %, hasta un mínimo de 3,32 mS/cm (usando el valor inicial del experimento de la lisina como valor de referencia para la conductividad en medio PP-A1), con un valor promedio de 4,027 mS/cm. Para la mayor parte del experimento, el valor de la conductividad fue inferior a 4,0.

Cuando se usó carbonato de amonio en el medio como fuente de nitrógeno, se observaron aumentos significativos tanto de la SCU como de la SEP. La SCU aumentó en un 19 % y la SEP aumentó en un 57 %. Los valores brutos de la SCU y la SEP disminuyeron durante el experimento en un 15 % y un 23 %, respectivamente. La conductividad durante este experimento disminuyó en un 46 %, hasta un mínimo de 4,33 mS/cm, con un valor promedio de 4,839 mS/cm.

Se ensayó también el carbonato de amonio como fuente de nitrógeno omitiendo el compuesto de la fórmula del medio y usándolo en cambio como solución de base. Este método de suministrar carbonato de amonio dio como resultado aumentos globales significativos de la SCU (19 %) y de la SEP (41 %) frente al valor de referencia. Se usaron dos concentraciones diferentes de carbonato de amonio 0,25 M y 0,125 M, y los resultados fueron ligeramente diferentes para cada una. Cada concentración daba una SCU y una SEP significativamente más elevadas que el valor de referencia del reactor. Cada concentración de base daba como resultado valores ligeramente diferentes para las dos métricas medidas, aunque las desviaciones típicas de estas mediciones se superponían entre sí. Las dos soluciones de base disminuyeron la conductividad en un 71 % (0,25 M) y un 78 % (0,125 M) hasta mínimos respectivos de 2,34 mS/cm y 1,77 mS/cm. Los promedios fueron 3,065 mS/cm y 1,982 mS/cm, respectivamente. La concentración del ion amonio en el reactor se midió justo antes y a lo largo de la duración del carbonato de amonio como experimento base. Los resultados de estas mediciones muestran que al reactor se le suministró un exceso de ion amonio (50-62 %) durante el experimento.

Se ensayó también bicarbonato de amonio como aditivo para el medio. Los datos experimentales muestran que hubo aumentos significativos tanto en la SCU como en la SEP. La SCU promedio aumentó por encima del valor de referencia en un 19 % y la SEP promedio aumentó por encima del valor de referencia en un 53 %. La conductividad durante este experimento disminuyó en un 50 %, hasta un mínimo de 4,02 mS/cm, con un valor promedio de 4,3 mS/cm. La concentración de ion amonio se controló igualmente durante esta fase del experimento. Los valores muestran que el ion estaba en un exceso del 26 % en el reactor.

Ejemplo 3: Efectos del aumento progresivo de la osmolaridad sobre el rendimiento del cultivo.

Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* C-01 en un biorreactor (BioFlo/CelliGen 115) con el medio siguiente. El flujo de medio promedio por gramo de células fue de 1 ml/g/minuto.

Producto químico	Límite
FeCl ₂ *4H ₂ O (g)	0,24
H ₃ PO ₄ (ml)	0,86
KCl (g)	3,00
MgCl ₂ *6H ₂ O (g)	0,48
NH ₄ Cl (g)	19,44
Cisteína HCl (g)	4,50
6 x Med A2 (ml)	15,0
6 x TE (ml)	4,6
Agua (l)	hasta 10

En este experimento de 21 días la conductividad del caldo de cultivo aumentó usando NaCl. Cada adición de NaCl a intervalos dados se muestra en la figura 28 de acuerdo con la siguiente pauta.

5

Concentraciones de NaCl tras cada adición.

Tiempo (h)	Concentración (g/l)
163	1
307	2
422	3
498	4
597	5,23
618	5
646	6
720	7
793	8
883	9
935	10
1001	11
1057	12
1119	13

10 La conductividad del cultivo aumentó con cada adición de NaCl. La captación de carbono específica (SCU), como indicador de la actividad de cultivo se midió a lo largo de todo el experimento. La Figura 28 muestra que con cada adición de NaCl, la SCU disminuía durante un periodo de tiempo pero se recuperaba después de un corto periodo de adaptación.

15 La Figura 28 se puede dividir en tres áreas de interés; 0-500 h (1), 500 -1100 h (2), y 1100-1200 h. El área 1, en la que la conductividad era inferior a 15 mS/cm, muestra que la adición de NaCl tiene menos impacto en la SCU: solo pequeñas pérdidas de la SCU seguidas de recuperaciones totales. El área 2, en la que la conductividad era superior a 15 mS/cm, muestra que la adición de NaCl tiene más impacto en la SCU: mayores oscilaciones de la SCU. En esta área las adiciones de NaCl provocaron grandes caídas de la SCU seguidas de grandes oscilaciones hacia arriba. En esta área final cuando la conductividad aumentó hasta aproximadamente 30 mS/cm o más, el cultivo
20 perdió su actividad.

Ejemplo 4: Efectos del aumento rápido de la osmolaridad sobre el rendimiento del cultivo.

25 Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* C-01 en un biorreactor (BioFlo/CelliGen 115) con el mismo medio que el descrito en el ejemplo 3. El flujo de medio promedio por gramo de células fue de 1,1 ml/g/minuto.

En este experimento de 10 días, la concentración de NaCl en el caldo se incrementó dos veces más rápido que la velocidad de incremento de la concentración de NaCl en el ejemplo 3 de acuerdo con la pauta siguiente.

30

Concentraciones de NaCl tras cada adición.

Tiempo (h)	Concentración (g/l)
96	7
121	9
144	11
498	13

5 La Figura 29 muestra la SCU del cultivo a diferentes conductividades. Al igual que en el ejemplo 3, el cultivo perdió su actividad una vez que la conductividad del cultivo llegó a aproximadamente 30 mS/cm.

Ejemplo 5: Efecto de la velocidad de alimentación del CO sobre la conductividad.

10 Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* C-01 en un biorreactor (BioFlo/CelliGen 115) con el mismo medio que el descrito en el ejemplo 3.

15 Se ajustó la conductividad del cultivo ajustando la fuerza del medio de cultivo, por ejemplo la concentración de todos los componentes, excepto la vitamina, en el medio de cultivo en 1,5 y 2 veces a fin de incrementar la conductividad del cultivo de ~ 7 mS a ~ 9,5 mS y ~ 12 mS, respectivamente.

20 Los experimentos se iniciaron con la densidad celular inicial de 0,38 (+/-0,02) o 0,785 g/l. La composición del sintegas era de un 30 % de CO, un 15 % de H₂, un 10 % de CO₂ y un 45 % de N₂. Se llevaron a cabo diversos experimentos de puesta en marcha para cada conductividad del cultivo dada a fin de determinar la velocidad de alimentación de gas específico apropiada (que se puede usar en la práctica) para una conductividad del cultivo dada. A lo largo de estos experimentos, se determinó la velocidad de alimentación de gas apropiada para una conductividad del cultivo dada. Tal como se ilustra en la figura 30, la velocidad de alimentación de CO apropiada/funcional se representó frente a la conductividad del cultivo, en la que

$$y = -6,0327x + 12,901$$

25 Velocidad de alimentación de CO específica = cantidades molares de CO por gramo de células

30 Velocidad de alimentación del CO apropiada/funcional = velocidad de alimentación de CO que puede duplicar la C-01 en 40 horas.

Aunque la invención divulgada en el presente documento se ha descrito mediante realizaciones, ejemplos y aplicaciones específicos de la misma, los expertos en el arte podrían efectuar diversas modificaciones y variaciones de la misma sin apartarse del alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la fermentación de un sustrato gaseoso que contiene CO que comprende:

- 5 suministrar un sustrato gaseoso que contiene CO a un medio de fermentación y fermentar el sustrato gaseoso que contiene CO poniéndolo en contacto con una o más bacterias acetogénicas; controlar la conductividad del medio durante la fermentación mientras se proporciona un rendimiento de espacio-tiempo (STY) de 10 g de etanol/(l.día) o superior, en el que el medio de fermentación tiene una conductividad de 30 mS/cm o inferior; y
- 10 mantener una relación de la conductividad con respecto a la captación de carbono específica (SCU en mmoles/minuto/gramo de células secas) de acuerdo con una fórmula en la que $SCU = SCU_{max} - F \cdot \text{conductividad}$, en la que SCU_{max} es hasta 3 y $F =$ de 0,05 a 1.

15 2. El proceso de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato gaseoso que contiene CO tiene una relación CO/CO₂ de 0,75 o superior.

3. El proceso de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la bacteria acetogénica se selecciona entre el grupo que consiste en *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobium noteroae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldaranaerobacter subterraneus pacificus*, *Carboxydotherrmus 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 thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Ruminococcus productus*, *Thermoanaerobacter kivui*, y mezclas de las mismas.

20

25

30

4. El proceso de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de fermentación incluye una fuente de nitrógeno seleccionada entre el grupo que consiste en hidróxido de amonio, acetato de amonio, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, y mezclas de los mismos.

35

5. El proceso de fermentación de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio de fermentación incluye hidróxido de amonio como fuente de nitrógeno.

40

FIG. 2

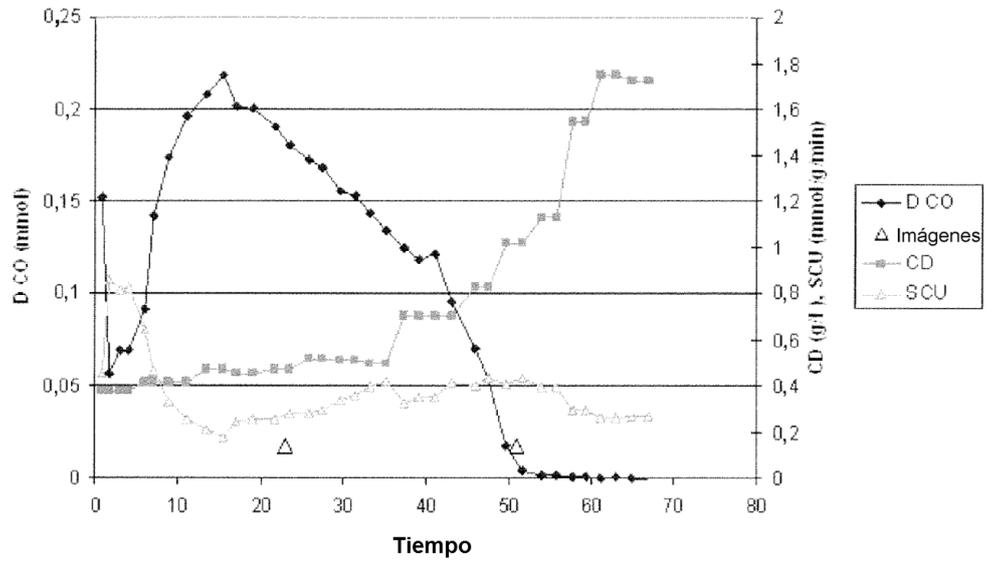


FIG 3

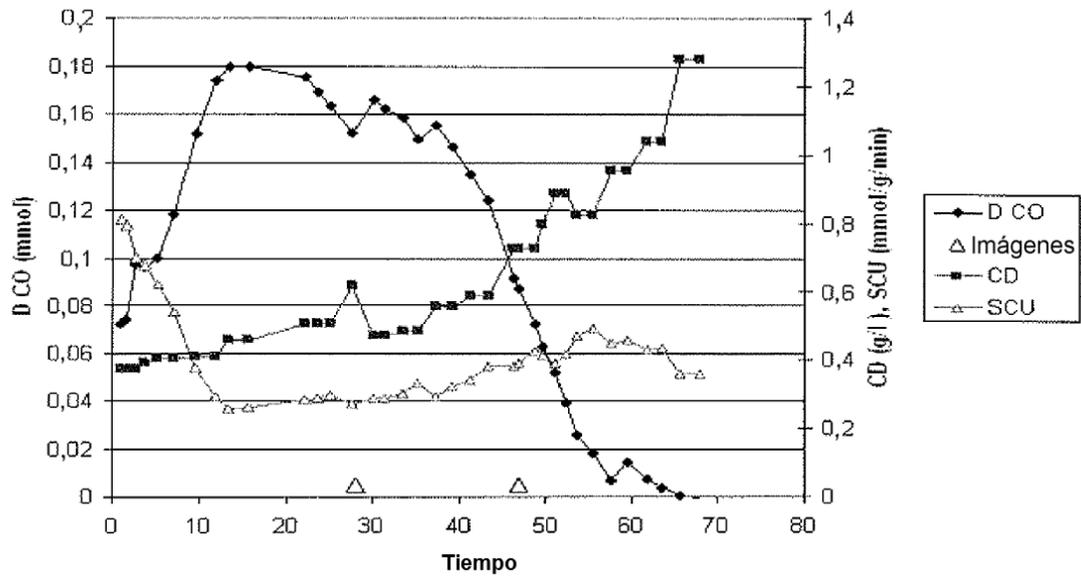


FIG. 4

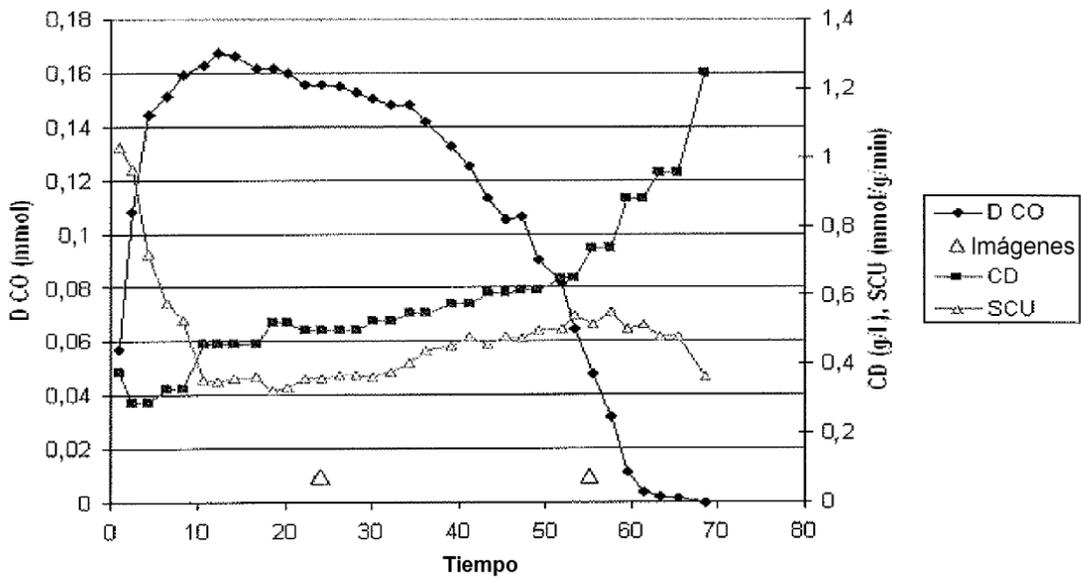


FIG. 5

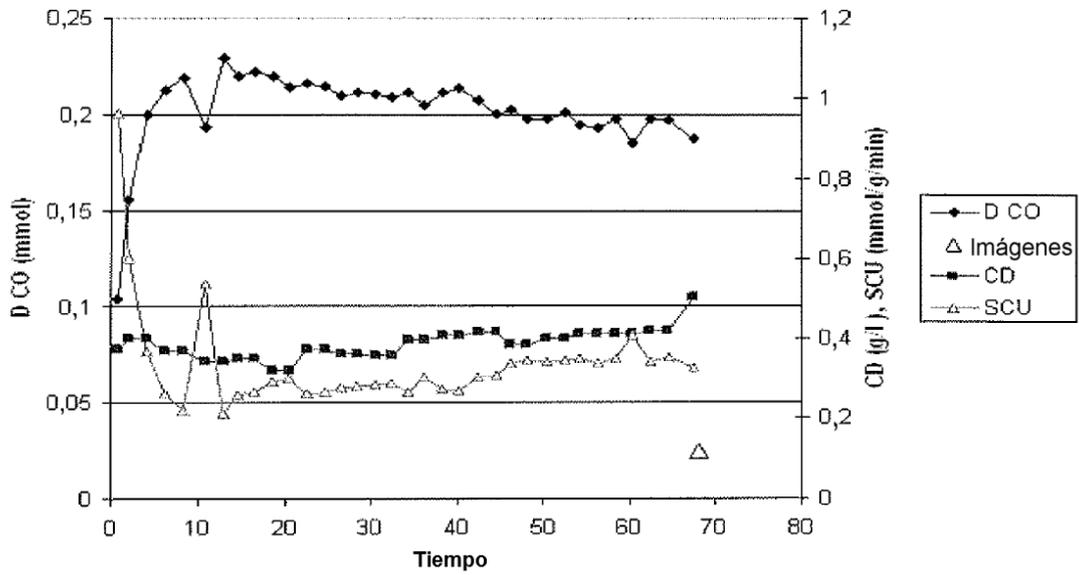


FIG. 6

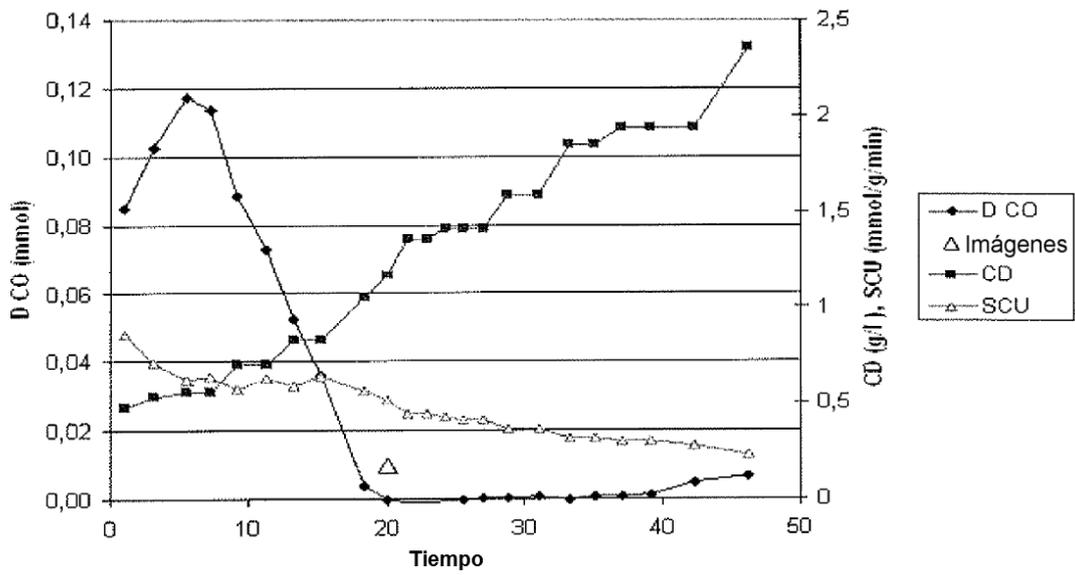


FIG. 7

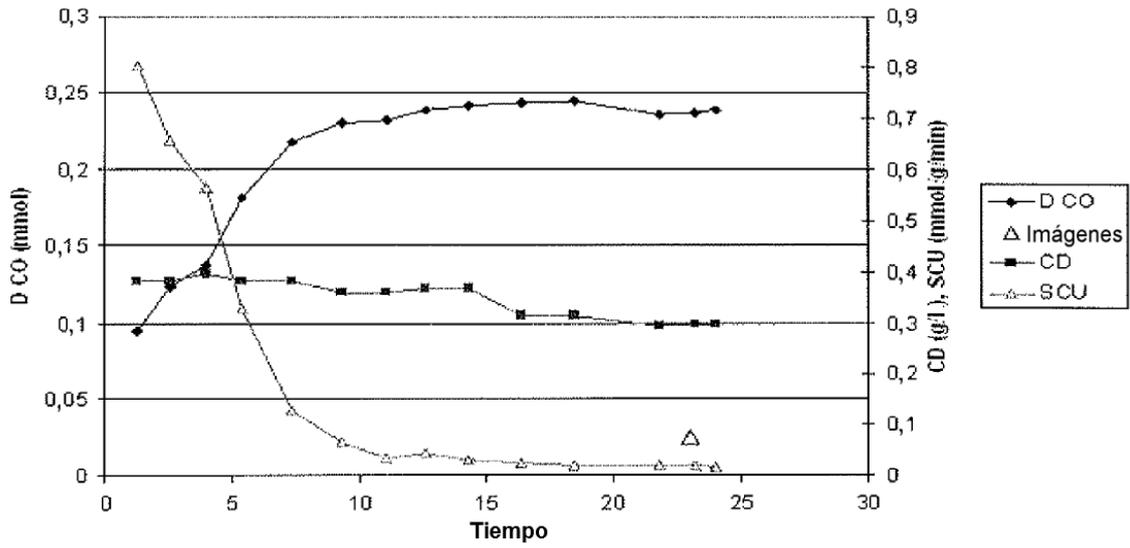


FIG. 8

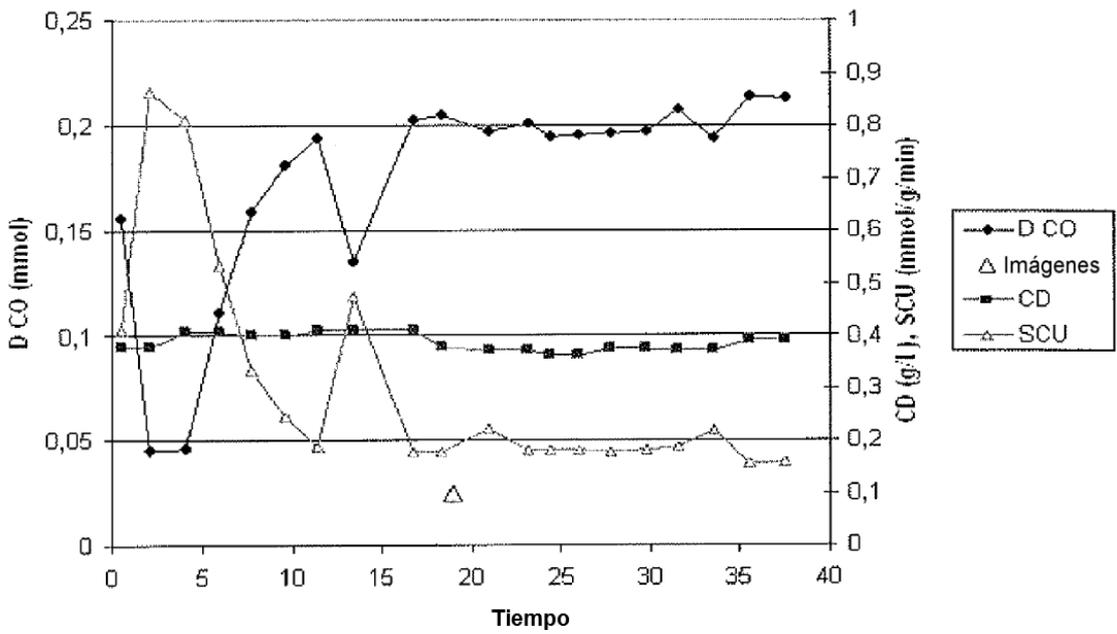


FIG. 9

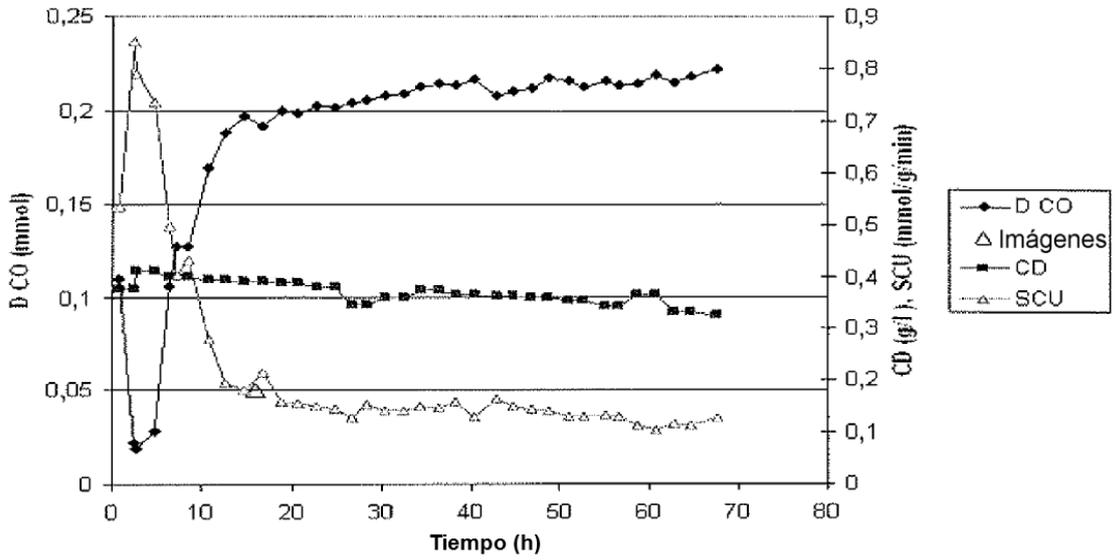


FIG. 10

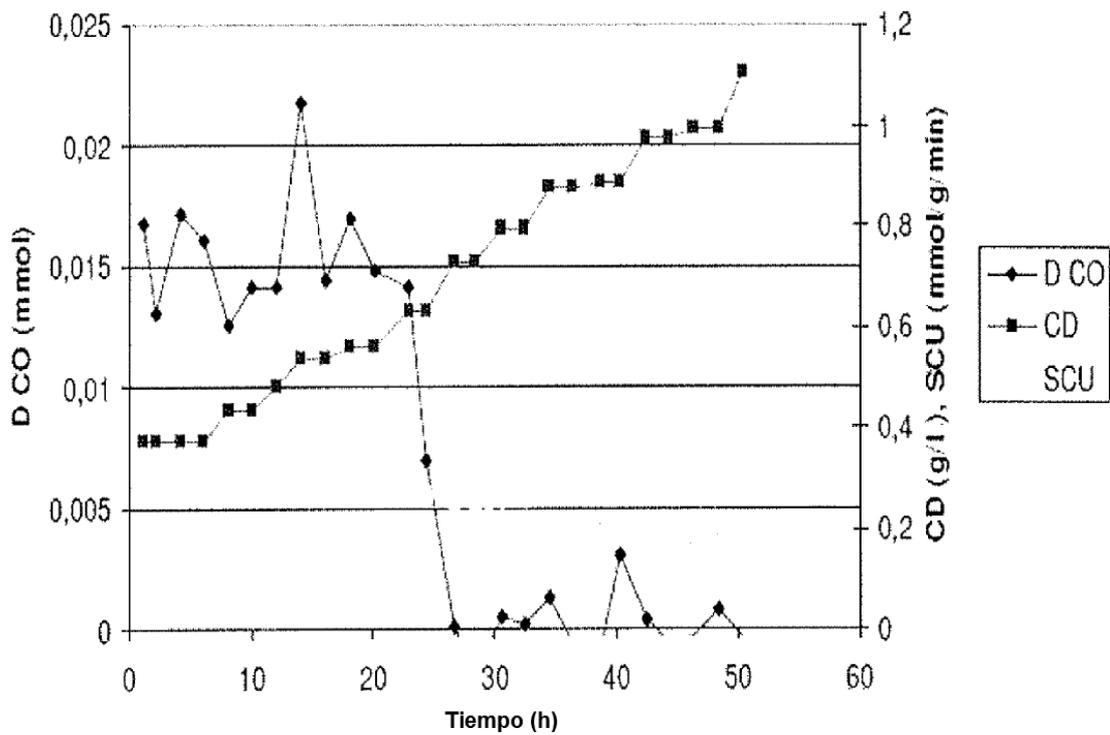


FIG. 11

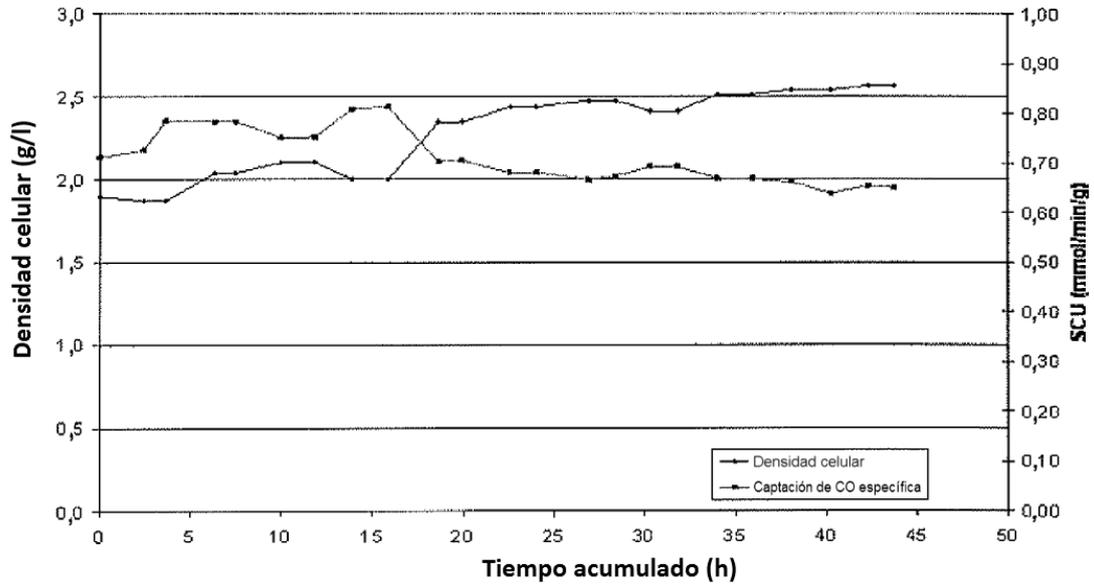


FIG. 12

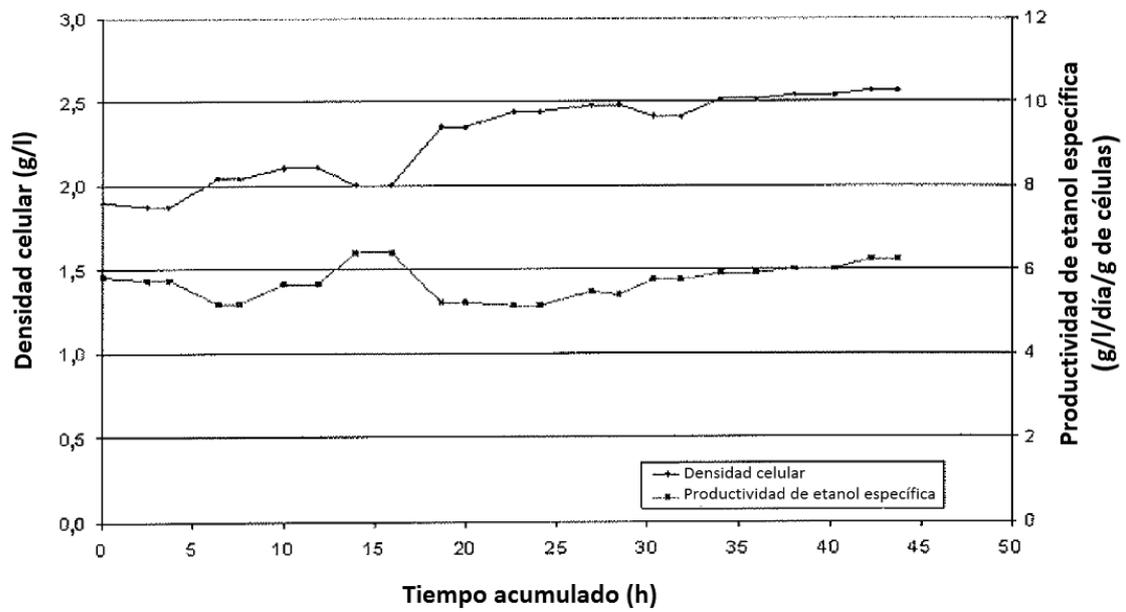


FIG. 13

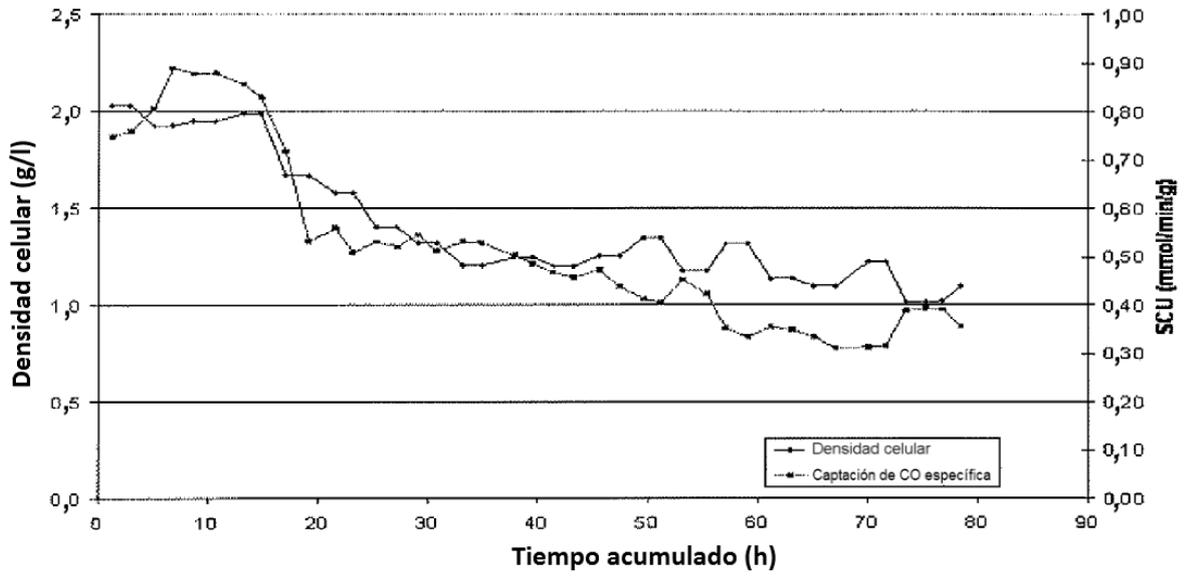


FIG. 14

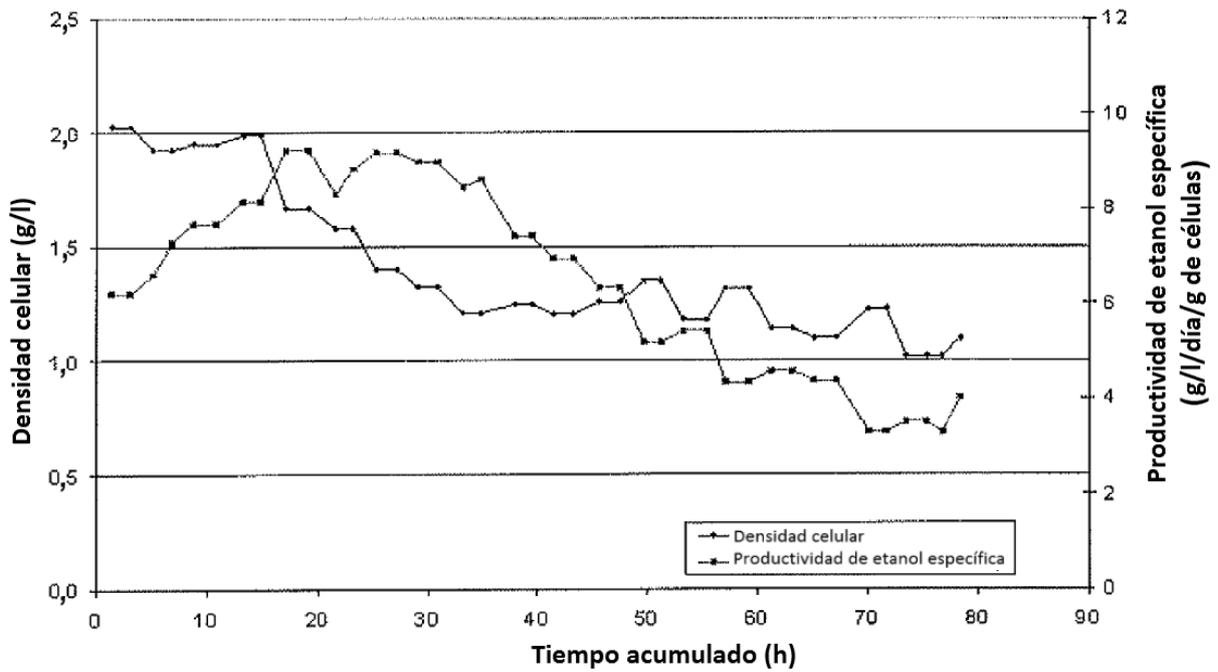


FIG. 15

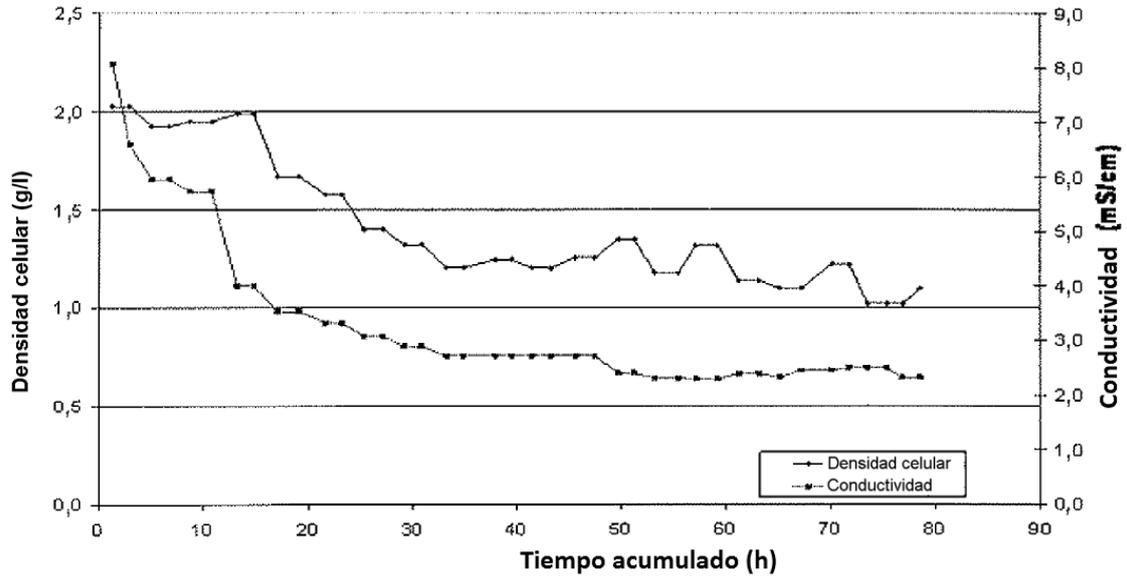


FIG. 16

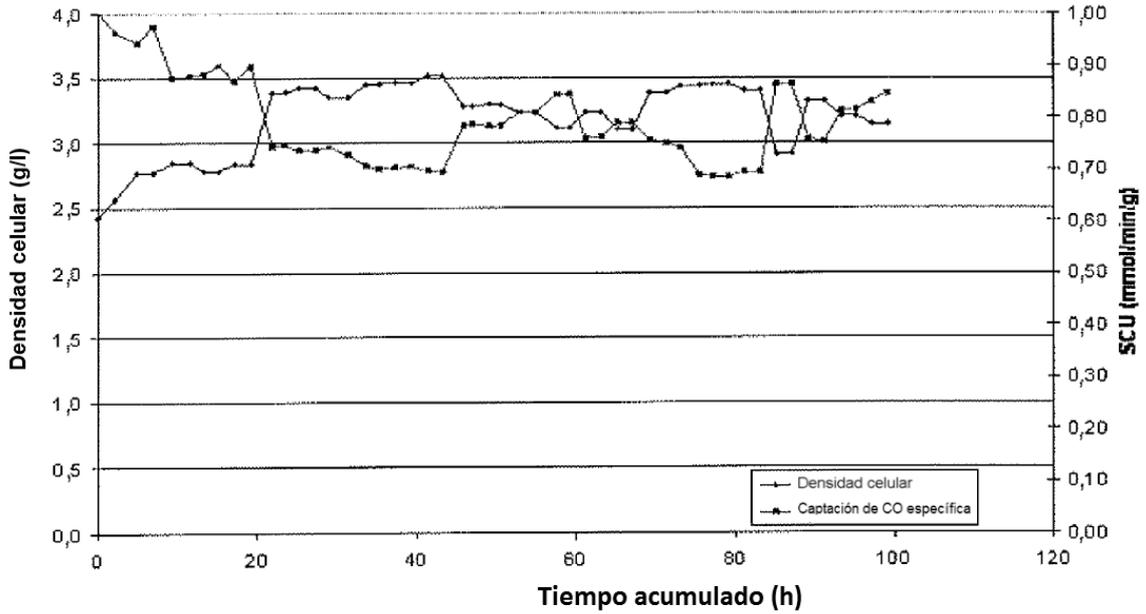


FIG. 17

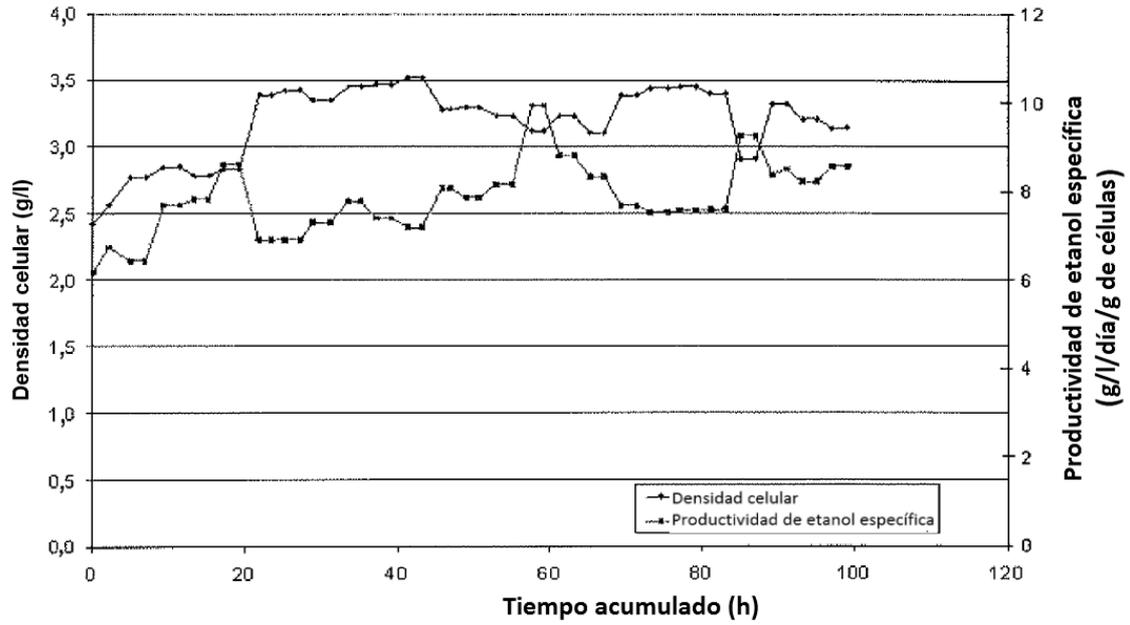


FIG. 18

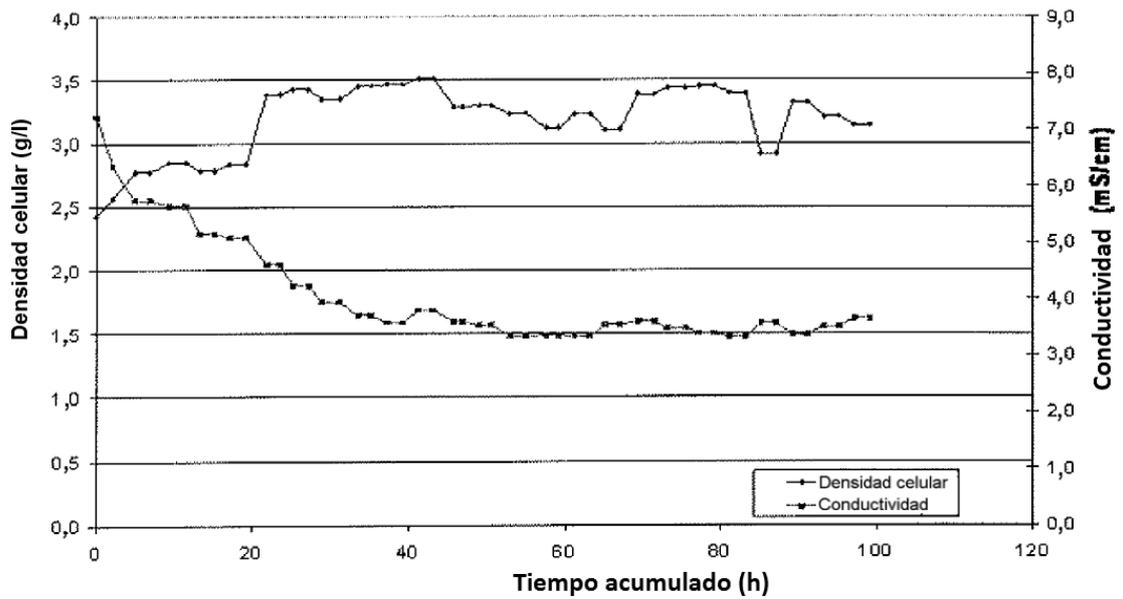


FIG. 19

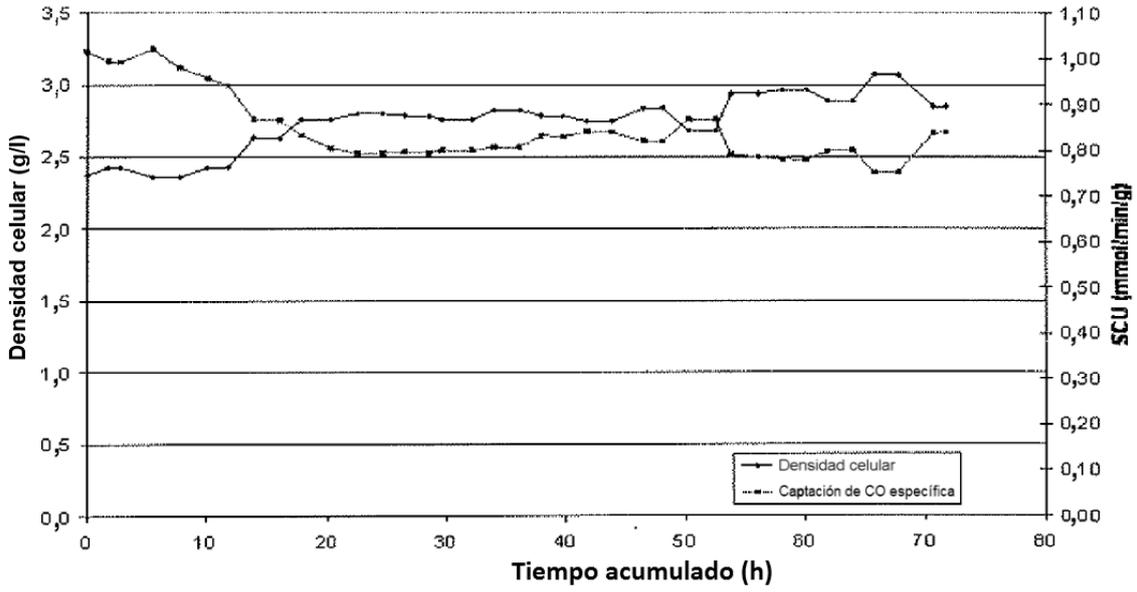


FIG. 20

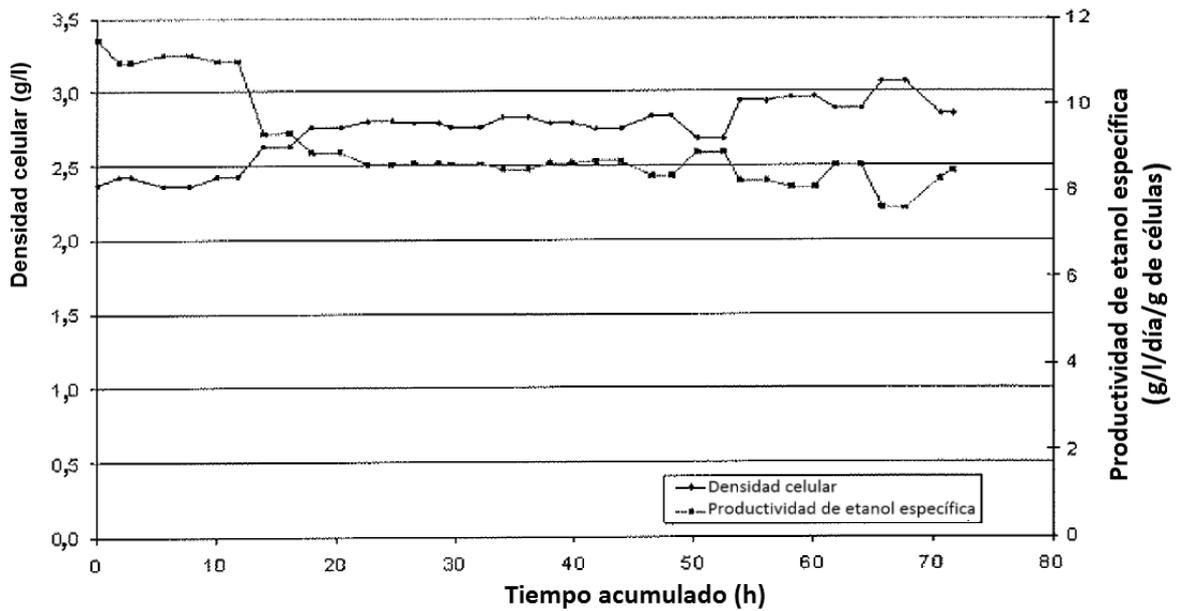


FIG. 21

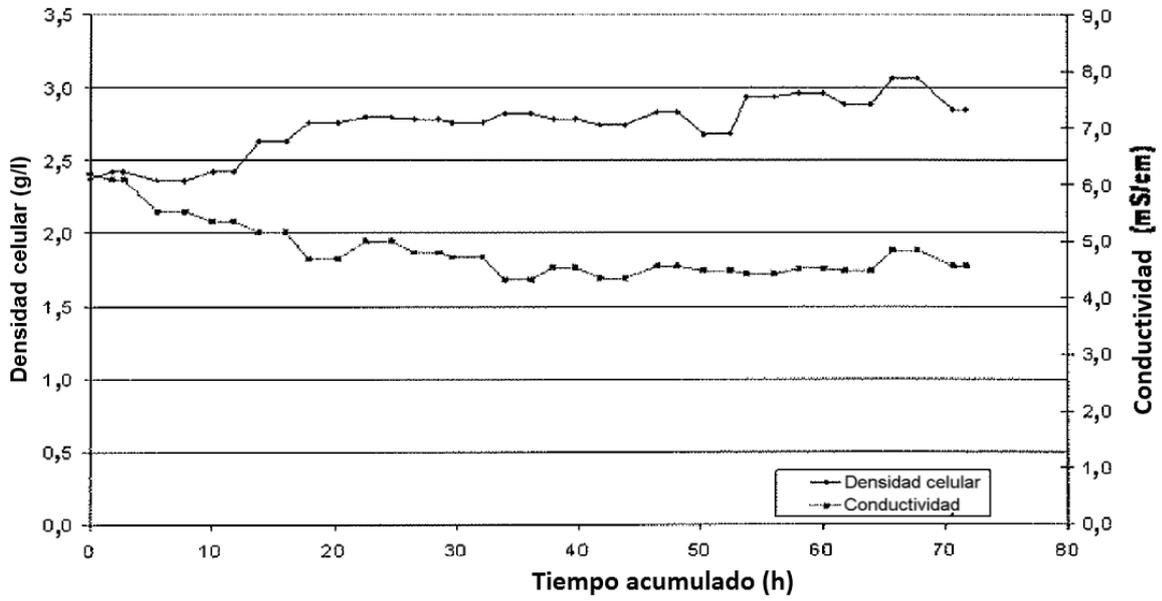


FIG. 22

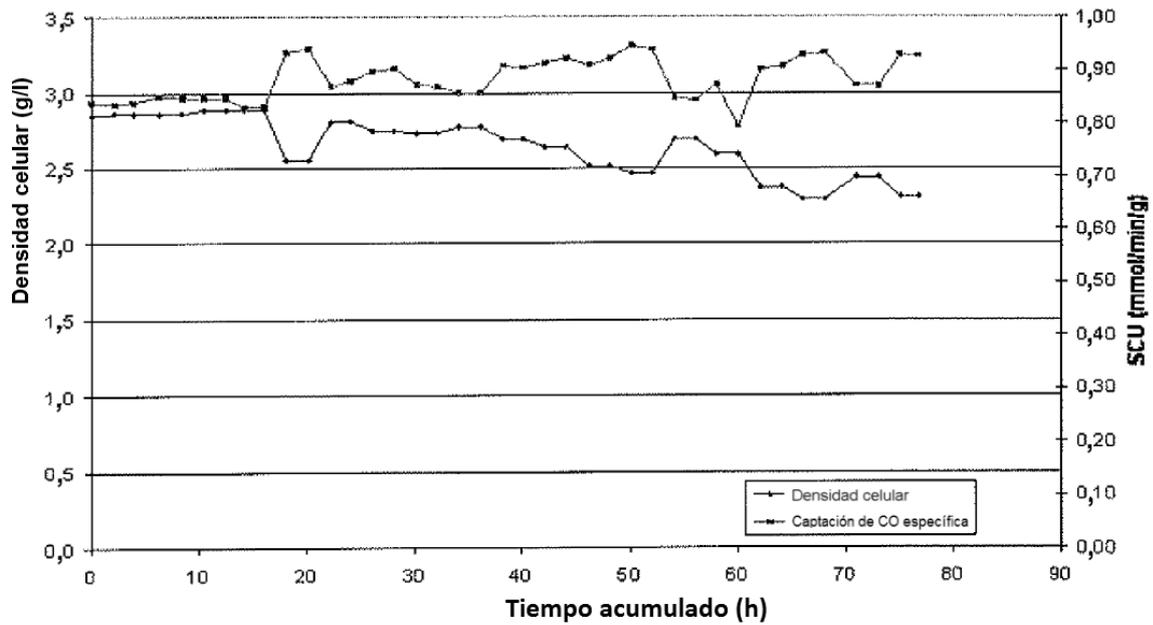


FIG. 23

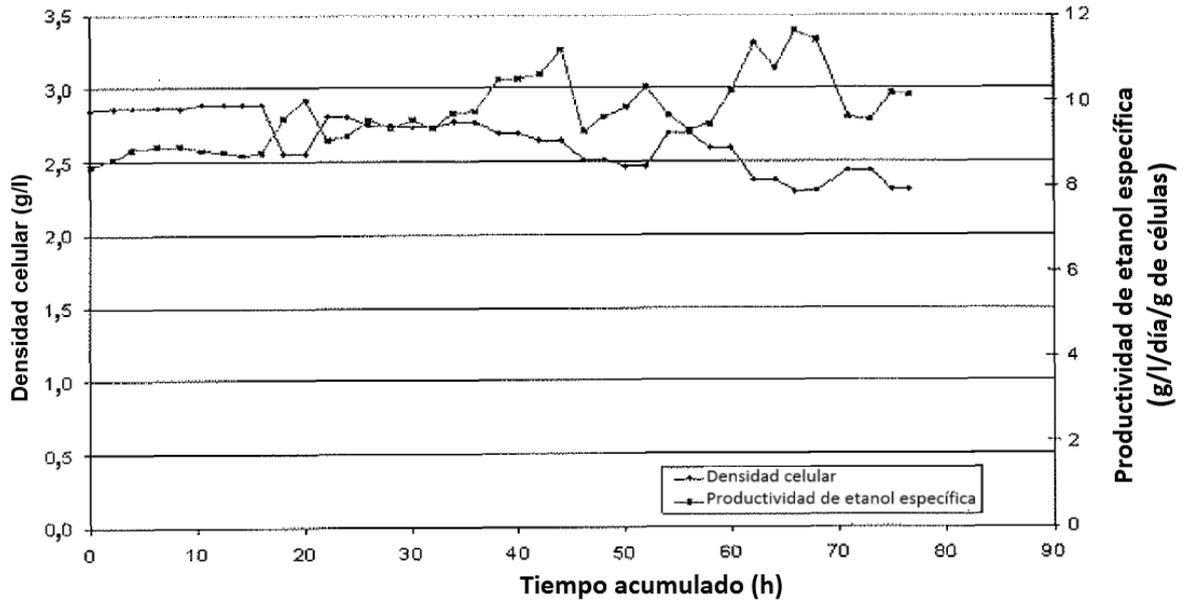


FIG. 24

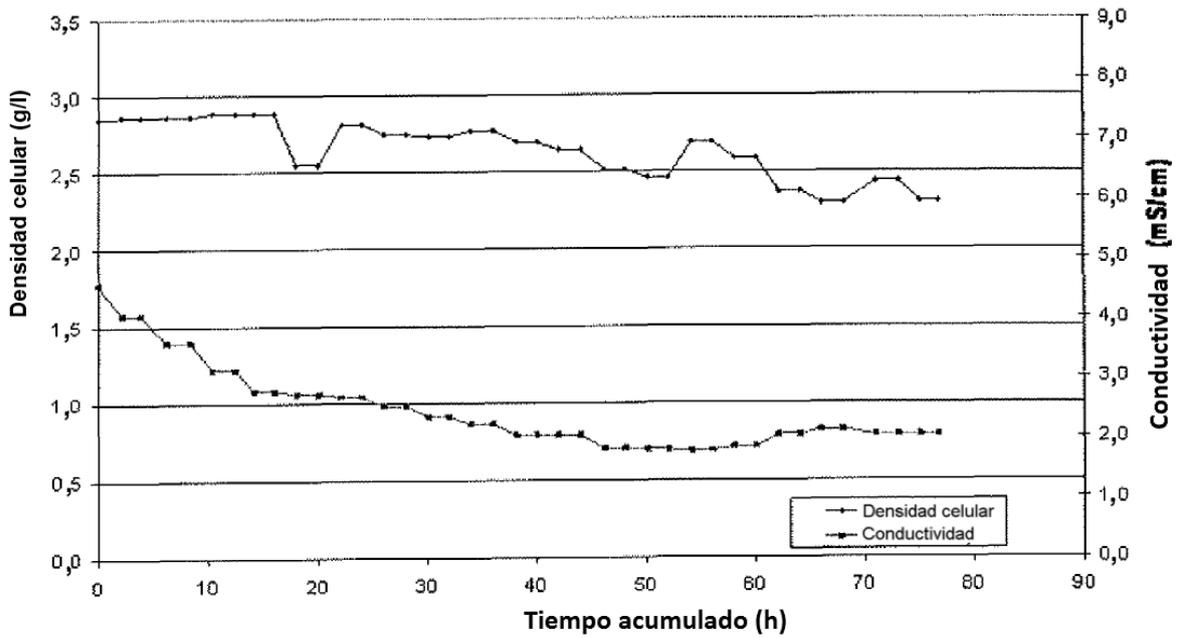


FIG. 25

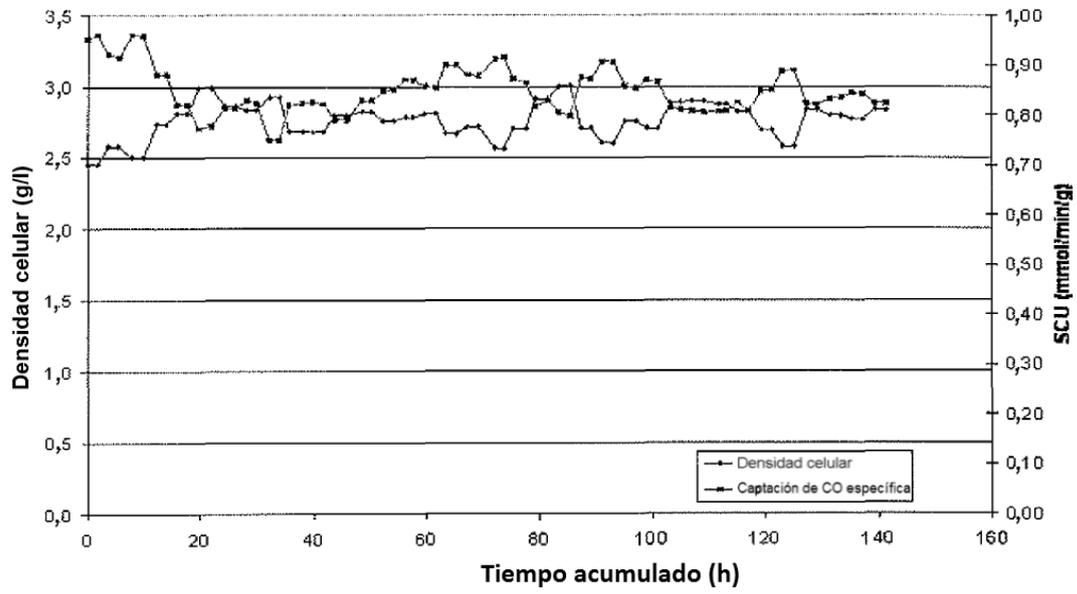


FIG. 26

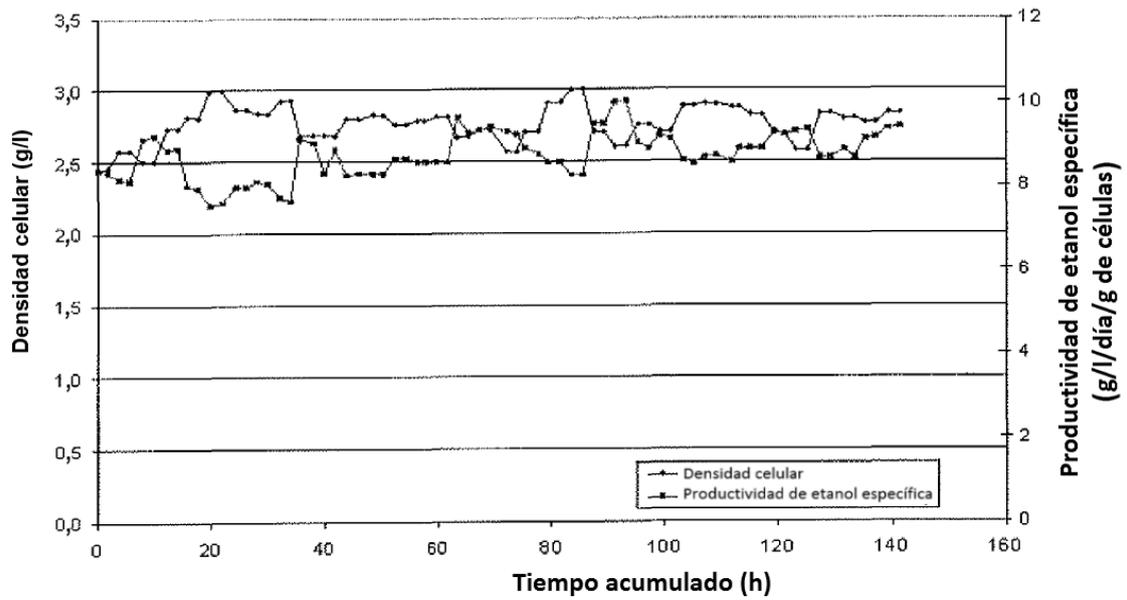


FIG. 27

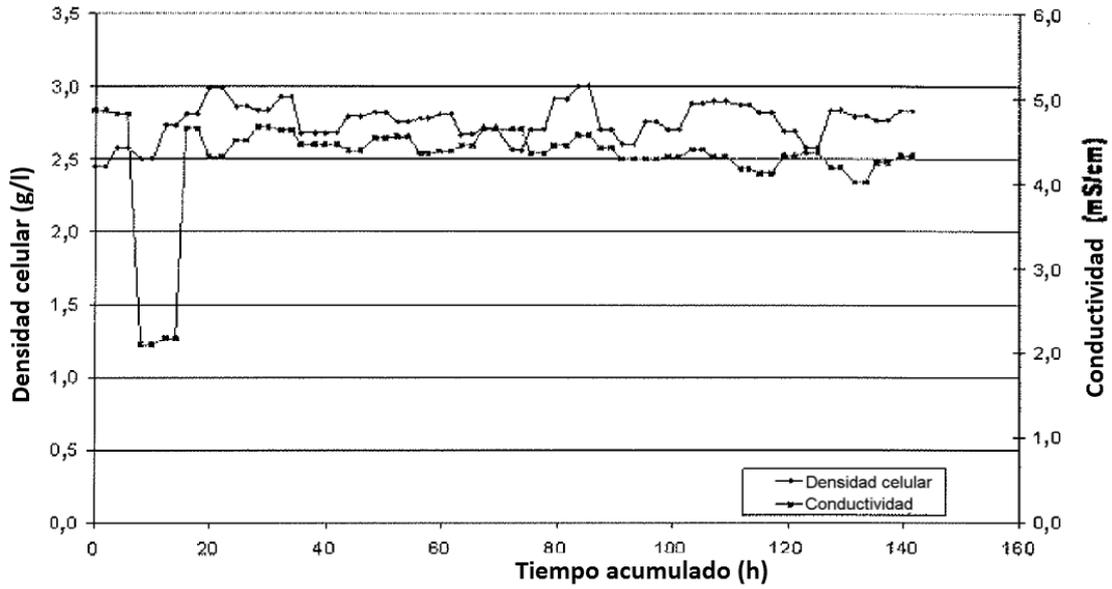


FIG. 28

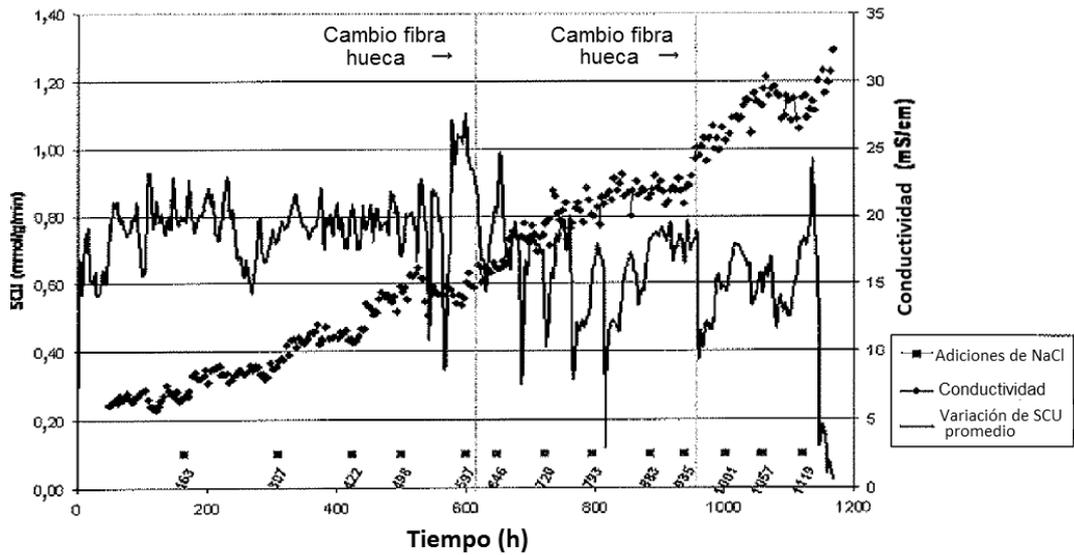


FIG. 29

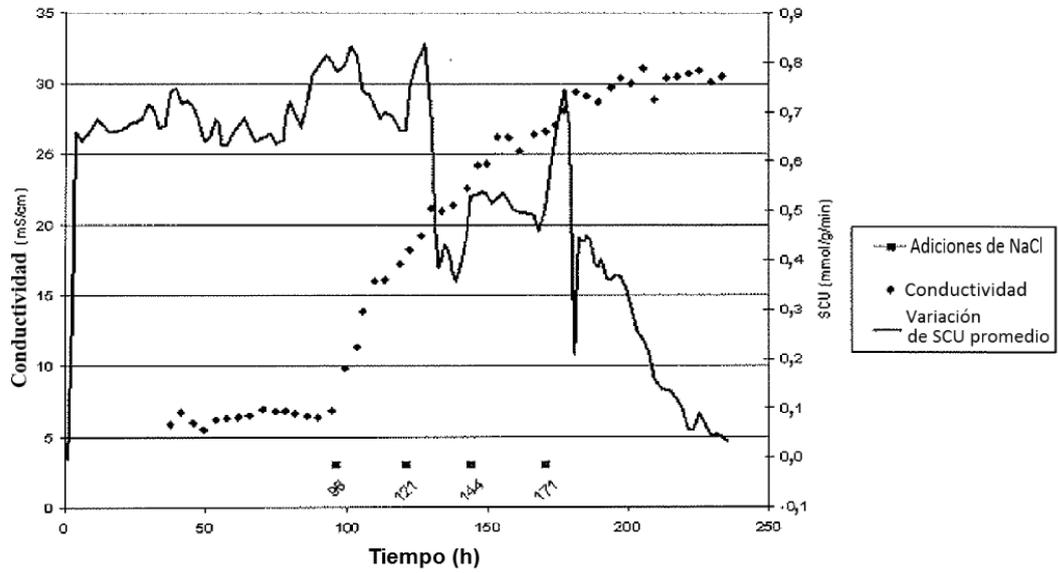


FIG. 30

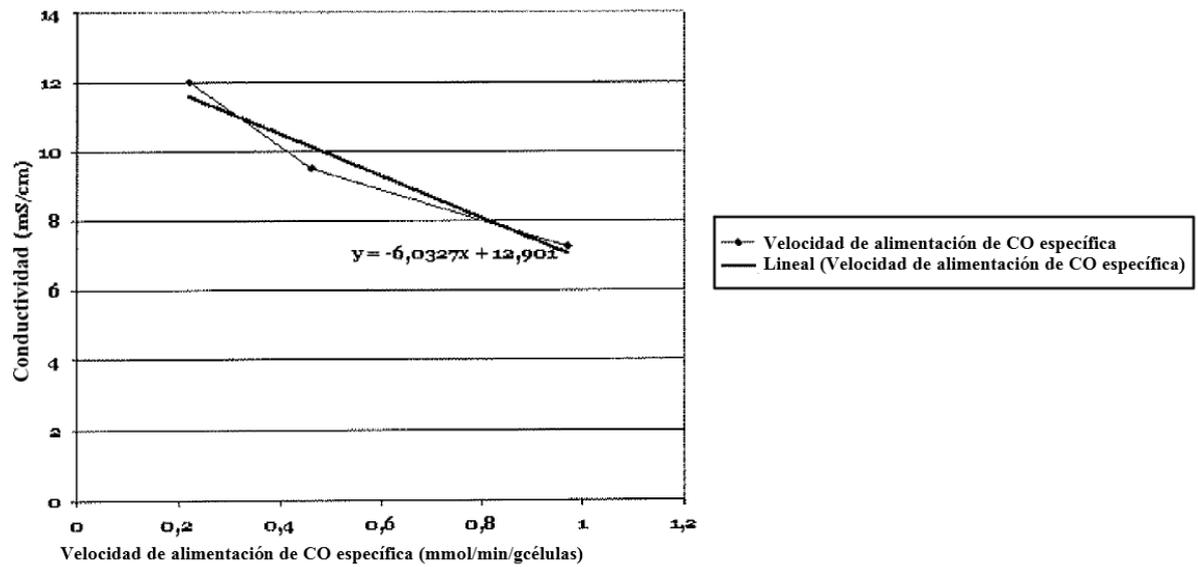


FIG. 31

