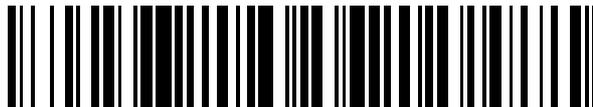


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 522**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12Q 3/00 (2006.01)

G01N 21/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013 PCT/US2013/060234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14047081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013 E 13771010 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2898080**

54 Título: **Un proceso para evitar la inhibición de acetógenos por CO**

30 Prioridad:

19.09.2012 US 201261702824 P

19.09.2012 US 201261702826 P

19.09.2012 US 201261702832 P

19.09.2012 US 201261702837 P

05.09.2013 US 201314018487

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

06.04.2018

73 Titular/es:

INEOS BIO SA (100.0%)

Avenue Des Uttins 3

1180 Rolle, CH

72 Inventor/es:

SENARATNE, RYAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 662 522 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un proceso para evitar la inhibición de acetógenos por CO

- 5 Se proporciona un proceso para fermentar sustratos gaseosos que contienen CO. Más específicamente, el proceso incluye determinar la concentración de CO en un primer medio de fermentación en una primera zona de fermentación. Si la concentración de CO en el primer medio de fermentación tiene un valor calculado de aproximadamente 0.12 mM o mayor, entonces se proporciona al menos una porción del gas de síntesis proporcionado a la primera zona de fermentación a una o más zonas de fermentación subsecuentes en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración calculada de CO en cualquier zona de fermentación subsecuente de aproximadamente 0.12 mM o menos.

ANTECEDENTES

- 15 Los microorganismos acetogénicos pueden producir etanol a partir del monóxido de carbono (CO) mediante la fermentación de sustratos gaseosos. Las fermentaciones que utilizan microorganismos anaeróbicos del género *Clostridium* producen etanol y otros productos útiles. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,173,429 describe *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 49587, un microorganismo anaeróbico que produce etanol y acetato a partir de gas de síntesis. La Patente de los Estados Unidos No. 5,807,722 describe un método y aparato para convertir gases residuales en ácidos orgánicos y alcoholes utilizando *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 55380. La Patente de los Estados Unidos No. 6,136,577 describe un método y aparato para convertir gases residuales en etanol usando *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 55988 y 55989.

- 25 Las descripciones de procesos de fermentación también se pueden encontrar en WO 2012/074544; DIMPLE K KUNDIYANA ET AL, "Efecto de la limitación de nutrientes y el diseño de fermentador continuo de dos etapas sobre las productividades durante la fermentación de gas de síntesis", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 102, no. 10, 8 de marzo de 2011, páginas 6058-6064; HEISKANEN ET AL, "The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyribacterium methylotrophicum*", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 41, no. 3, 19 May 2007, pages 362-367; and MARCO RICCI & CARLO PEREGO, "From syngas to fuels and chemicals: Chemical and biotechnological routes", 23 September 2011 (http://www.eurobioref.org/Summer_School/Lectures_Slides/day6/L_17_M.Ricci.pdf).

- 35 Muchos microorganismos acetogénicos son poco adecuados para el bioprocesamiento a escala industrial y, por lo tanto, no han demostrado viabilidad comercial para este fin. Dichos microorganismos tienen un tiempo de duplicación lento y bajas productividades totales. Además, muchas técnicas para la manipulación genética (inactivación, sobreexpresión de transgenes a través de la integración o propagación del plásmido episómico) son ineficaces, lentas, laboriosas o inexistentes.

- 40 Los microorganismos acetogénicos se pueden cultivar para producir etanol a partir del monóxido de carbono. El proceso de crecimiento puede implicar el cultivo de bacterias acetogénicas en cantidades crecientes de CO a lo largo del tiempo. Los microorganismos acetogénicos se pueden cultivar para producir etanol a partir de gas de síntesis que incluye monóxido de carbono. El proceso de crecimiento puede implicar el cultivo de bacterias acetogénicas en cantidades crecientes de CO a lo largo del tiempo. Los niveles altos o bajos de CO en la fermentación pueden dar como resultado una menor productividad.

RESUMEN

- 50 Un proceso es efectivo para mantener altos niveles de productividad de etanol durante la fermentación de gas de síntesis. El proceso es efectivo para disminuir los tiempos de latencia y mantener un cultivo en estado estable controlando la concentración de CO y minimizando los efectos de las concentraciones altas o bajas de CO durante la fermentación.

Se proporciona un proceso de fermentación de gas de síntesis que comprende:

- 55 proporcionar una primera zona de fermentación y una o más zonas de fermentación subsecuentes;
- suministrar gas de síntesis a cada zona de fermentación de una en una o simultáneamente a una o más zonas de fermentación y fermentar el gas de síntesis utilizando bacterias acetogénicas; en donde el proceso comprende además:
- 60 proporcionar gas de síntesis a la primera zona de fermentación;
- fermentar el gas de síntesis; y
- 65 determinar una concentración de CO en el medio de fermentación en la primera zona de fermentación, en donde si la concentración de CO en el medio de fermentación en la primera zona de fermentación tiene un valor calculado de

0.12 mM o mayor, siendo proporcionada entonces al menos una porción del gas de síntesis a la primera zona de fermentación se proporciona a una o más zonas de fermentación subsecuentes en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración calculada de CO en cualquier zona de fermentación subsecuente de 0.12 mM o menos, y

5 donde la concentración de CO se calcula determinando un factor de suministro, donde el factor de suministro = (% de CO de espacio de cabeza ÷ 100) x (((presión del reactor medida (psig) + presión atmosférica)) ÷ (presión atmosférica x 14.7)).

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

15 La figura 1 es una vista en perspectiva de un fermentador con múltiples zonas de fermentación.

La figura 2 es una vista en perspectiva de una serie de fermentadores.

20 La Figura 3 ilustra el efecto del control de la concentración de CO disuelto al mantener la presión parcial de CO del espacio de cabeza sobre la masa de células de *Clostridium ljungdahlii* usando un alto gas de alimentación de CO.

La Figura 4 ilustra el efecto del control de la concentración de CO disuelto al mantener la presión parcial de CO en el espacio de cabeza sobre la masa de células de *Butyribacterium methylophilum* usando un alto gas de alimentación de CO.

25 La Figura 5 ilustra el efecto de la concentración de CO sobre la masa celular de *Clostridium ljungdahlii* usando un bajo gas de alimentación de CO.

30 La Figura 6 ilustra el efecto de la concentración de CO sobre la masa celular de *Butyribacterium methylophilum* usando un bajo gas de alimentación de CO.

La Figura 7 muestra el efecto de las tasas de alimentación de CO sobre la productividad de etanol, la masa celular, la conversión de CO y la captación específica de CO.

35 La Figura 8 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 25 ml/min.

La Figura 9 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 35 ml/min.

40 La Figura 10 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 40 ml/min.

45 La Figura 11 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 45 ml/min.

La Figura 12 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 50 ml/min.

50 La Figura 13 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 50 ml/min con un inóculo inicial más alto.

La Figura 14 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 45 ml/min con un inóculo inicial más alto.

55 La Figura 15 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 35 ml/min con un inóculo inicial más alto.

60 La Figura 16 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 30 ml/min con un inóculo inicial más alto.

La Figura 17 ilustra el crecimiento de *Clostridium ljungdahlii* en medio de crecimiento 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 20 ml/min con un inóculo inicial más alto.

65 Los caracteres de referencia correspondientes indican componentes correspondientes en las diversas vistas de las figuras. Los expertos en la técnica apreciarán que los elementos de las figuras se ilustran por simplicidad y claridad y

no han sido dibujados necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos en las figuras pueden exagerarse 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 viables, a menudo no se representan con el fin de facilitar una visión menos obstruida de estos diversos aspectos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La siguiente descripción no debe tomarse en un sentido limitativo, sino que se hace meramente con el propósito de describir los principios generales de las realizaciones de ejemplo. El alcance de la invención debería determinarse con referencia a las reivindicaciones.

Las fermentaciones de gas de síntesis realizadas en biorreactores con bacterias medianas y acetogénicas como se describe en este documento son efectivas para proporcionar conversiones de CO de gas de síntesis en alcoholes y otros productos. El control de las concentraciones de CO en la fermentación mediante la determinación de la concentración de CO en el medio de fermentación es eficaz para proporcionar altos niveles de productividad. En este aspecto, la productividad puede expresarse como STY (rendimiento del espacio tiempo expresado como g de etanol/(L·día). En este aspecto, el proceso es efectivo para proporcionar un STY (rendimiento espacio tiempo) de al menos aproximadamente 10 g de etanol/(L· día). Los posibles valores de STY incluyen aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 200 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 160 g etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 120 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 80 g de etanol/ (L·día), en otro aspecto, aproximadamente 20 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 140 g de etanol/(L· día), en otro aspecto, aproximadamente 20 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 100 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 40 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 140 g de etanol/(L·día), y en otro aspecto, aproximadamente 40 g de etanol/(L·Día) a aproximadamente 100 g de etanol/(L·día).

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los siguientes términos, tal como se usan a lo largo de este documento para la presente divulgación, se definen a continuación y pueden incluir las formas de definiciones en singular o plural que se definen a continuación:

El término "aproximadamente" que modifica cualquier cantidad se refiere a la variación en esa cantidad encontrada en condiciones del mundo real, 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 se modifica por "aproximadamente" incluye la variación y el grado de cuidado típicamente empleados en la medición en una condición experimental en una planta de producción o laboratorio. Por ejemplo, la cantidad de un componente de un producto cuando se modifica por "aproximadamente" incluye la variación entre lotes en múltiples experimentos en la planta o laboratorio y la variación inherente al método analítico. Ya sea o no modificado por "aproximadamente", las cantidades incluyen equivalentes a esas cantidades. Cualquier cantidad indicada aquí y modificada por "aproximadamente" también se puede emplear en la presente divulgación como la cantidad no modificada por "aproximadamente".

El término "singas" o "gas de síntesis" significa 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 la reforma de vapor de gas natural o hidrocarburos para producir hidrógeno, la gasificación de carbón y en algunos tipos de instalaciones de gasificación de residuos a energía. El nombre proviene de su uso como productos intermedios en la creación de gas natural sintético (SNG) y para la producción de amoníaco o metanol. El gas de síntesis es combustible y se usa a menudo como fuente de combustible o como intermediario para la producción de otros productos químicos.

El término "fermentador" incluye un dispositivo de fermentación que consta de uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías, que incluye el Reactor de Tanque Agitado Continuo (CSTR), Reactor de Células Inmovilizadas (ICR), Reactor de Lecho de Trituración (TBR), Lecho Móvil Reactor de Biopelícula (MBBR), Columna de Burbujas, Fermentador de Elevación de Gas, Reactor de Membrana, tal como un Biorreactor de Membrana de Fibra Hueca (HFMBR), Mezclador Estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido.

Los términos "fermentación", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del proceso. En un aspecto, la fermentación se refiere a la conversión de CO en alcohol.

El término "densidad celular" significa la masa de células de microorganismos por unidad de volumen de caldo de fermentación, por ejemplo, gramos/litro.

El término "incrementar la eficiencia", " eficiencia incrementada" y similares, cuando se usa en relación con un proceso de fermentación incluye incrementar uno o más de la tasa de crecimiento de microorganismos en la fermentación, el volumen o la masa del producto deseado (como alcoholes) producido por volumen o masa de sustrato (tal como monóxido de carbono) consumido, la tasa de producción o nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido en comparación con otros subproductos de la fermentación.

Gas de síntesis

El gas de síntesis puede proporcionarse desde cualquier fuente conocida. En un aspecto, el gas de síntesis puede provenir de la gasificación de materiales carbonosos. La gasificación implica la combustión parcial de biomasa en un suministro restringido de oxígeno. El gas resultante incluye principalmente CO y H₂. En este aspecto, el gas de síntesis contendrá al menos aproximadamente 10% en moles de CO, en un aspecto, al menos aproximadamente 20% en moles, en un aspecto, aproximadamente 10 a aproximadamente 100% en moles, en otro aspecto, aproximadamente 20 a aproximadamente 100% en moles de CO, en otro aspecto, aproximadamente 30 a aproximadamente 90% en moles de CO, en otro aspecto, aproximadamente 40 a aproximadamente 80% en moles de CO, y en otro aspecto, aproximadamente 50 a aproximadamente 70% en moles de CO. Algunos ejemplos de métodos y aparatos de gasificación adecuados son proporcionados en los Números de Serie de los EE. UU. 61/516,667, 61/516,704 y 61/ 516,646, todas las cuales fueron presentadas el 6 de abril de 2011 y en los Números de Serie de los EE. UU. 13/427,144, 13/427,193 y 13/427,247, todas las cuales fueron presentadas el 22 de Marzo de 2012.

Dependiendo de la composición del gas de síntesis, el gas de síntesis puede proporcionarse directamente a un proceso de fermentación o puede modificarse adicionalmente para incluir una relación molar de H₂ a CO adecuada. En un aspecto, el gas de síntesis proporcionado al fermentador tiene una relación molar H₂ a CO de aproximadamente 0.2 o más, en otro aspecto, aproximadamente 0.25 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 0.5 o más. En otro aspecto, el gas de síntesis proporcionado al fermentador puede incluir aproximadamente 40 por ciento molar o más de CO más H₂ y aproximadamente 30 por ciento molar o menos de CO, en otro aspecto, aproximadamente 50 por ciento molar o más de CO más H₂ y aproximadamente 35 por ciento molar o menos de CO, y en otro aspecto, aproximadamente 80 por ciento molar o más CO más H₂ y aproximadamente 20 por ciento molar o menos de CO.

En otro aspecto, el proceso tiene aplicabilidad para soportar la producción de alcohol a partir de sustratos gaseosos tales como gases de combustión industriales que contienen CO de gran volumen. En algunos aspectos, un gas que incluye CO se deriva de residuos que contienen carbono, por ejemplo, gases residuales industriales o de la gasificación de otros desechos. Como tal, los procesos representan procesos efectivos para capturar carbono que de otro modo se agotaría en el medio ambiente. Ejemplos de gases de combustión industrial incluyen gases producidos durante la fabricación de productos de metales ferrosos, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinación de petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque.

En un aspecto, un separador de gas está configurado para separar sustancialmente al menos una porción de la corriente de gas, en donde 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, donde el CO₂ puede pasar a un eliminador de CO₂ y el resto de la corriente de gas (que comprende CO y H₂) puede pasarse a un biorreactor. Se puede utilizar cualquier separador de gases conocido en la técnica. En este aspecto, el gas de síntesis proporcionado al fermentador tendrá aproximadamente 10% en moles o menos de CO₂, en otro aspecto, aproximadamente 1% en moles o menos de CO₂, y en otro aspecto, aproximadamente 0.1% en moles o menos de CO₂.

Ciertas 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 para lograr una mayor eficacia de producción de alcohol y/o captura de carbono global. Por ejemplo, la concentración de H₂ en la corriente de sustrato puede aumentarse antes de que la corriente pase al biorreactor.

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

Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO gaseoso, también puede ser deseable tratarlo para eliminar cualquier impureza no deseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o depurarse usando métodos conocidos.

Diseño y Operación de Biorreactores

En un aspecto, un diseño de fermentador puede incluir diferentes zonas de fermentación en el mismo fermentador. Por ejemplo, fermentador grande o un reactor del tipo de columna de burbujas puede incluir diferentes zonas de fermentación. Se describen descripciones de diseños de fermentadores en los Números de Serie de los Estados Unidos 13/471,827 y 13/471,858, ambas presentadas el 15 de Mayo de 2012, y el Número de Serie de los EE. UU. 13/473,167, presentada el 16 de Mayo de 2012.

Como se muestra en la Figura 1, un fermentador 100 incluye múltiples zonas 200 de fermentación. Como se muestra, el fermentador 100 incluye una primera zona 200 de fermentación y cuatro zonas 201, 202, 203, 204 de fermentación adicionales. En otro aspecto, el fermentador 100 puede incluir dos o más zonas de fermentación, y puede incluir de dos a diez zonas de fermentación. Una zona de fermentación se define como espacio por encima de una entrada/burbujeador 122 de gas y por debajo de la siguiente entrada/burbujeador 122 de gas, o por encima de una entrada/burbujeador 122 de gas y la parte superior del fermentador 100. El medio, los microbios y los gases 305 en el fermentador 100 pueden fluir entre las zonas de fermentación. El fermentador 100 también puede incluir bombas 124. Las bombas 124 se pueden usar para la eliminación del producto 222 y para la eliminación de las muestras 210.

En un aspecto, el gas de síntesis entra en el fermentador 100 a través de un suministro 120 de gas de síntesis. El suministro 120 de gas de síntesis proporciona gas de síntesis a la entrada de gas/burbujeador 122. El medio y los nutrientes pueden suministrarse a través del suministro 250 de medio/nutriente. El gas de escape puede salir del fermentador 100 a través de un puerto 270 de gas de escape. Se puede suministrar gas de escape a una caldera de gas de ventilación. La caldera de gas de ventilación puede utilizarse para proporcionar vapor para la producción de energía.

De acuerdo con un aspecto, el proceso de fermentación se inicia mediante la adición de un medio al recipiente del reactor. Algunos ejemplos de composiciones de medios se describen en los Números de Serie de los Estados Unidos 61/650,098 y 61/650,093, presentadas el 22 de Mayo de 2012, y en la Patente de los Estados Unidos No. 7,285,402, presentada el 23 de julio de 2001. El medio puede esterilizarse para eliminar microorganismos indeseables y el reactor se inocula con los microorganismos deseados. La esterilización puede no ser siempre requerida.

Ejemplos de bacterias acetogénicas útiles incluyen las del género *Clostridium*, tales como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, que incluyen las descritas en los documentos WO 2000/68407, EP 117309, Patentes de los Estados Unidos 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) que incluyen las descritas en 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 los Estados Unidos No. 7,704,723 y " Biofuels and Bioproducts from Biomass-Generated Synthesis ", Hasan Atiyeh, presentado en Oklahoma EPSCoR Annual State Conference, 29 de Abril de 2010 y *Clostridium carboxidivorans* (ATCC PTA-7827) descrito en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2007/0276447. Otros microorganismos adecuados incluyen los del género *Moorella*, incluyendo *Moorella* sp. HUC22-1, y los del género *Carboxydotherrmus*. Se pueden usar cultivos mixtos de dos o más microorganismos.

Algunos ejemplos de bacterias útiles incluyen *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter 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 los mismos.

Tras la inoculación, se establece una tasa de alimentación de gas de alimentación inicial eficaz para proveer a la población inicial de microorganismos. El gas efluente se analiza para determinar el contenido del gas efluente. Los resultados del análisis de gases se usan para controlar las tasas de gas de alimentación. En este aspecto, el proceso proporciona una concentración calculada de CO a una relación de densidad celular inicial de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 0.9, en otro aspecto, aproximadamente 0.6 a aproximadamente 0.8, en otro aspecto, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 0.7, y en otro aspecto, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 0.6.

Al alcanzar los niveles deseados, la fase líquida y el material celular se retiran del reactor y se reponen con medio. El proceso es efectivo para aumentar la densidad celular a aproximadamente 2.0 gramos/litro o más, en otro aspecto, aproximadamente 2 a aproximadamente 25 gramos/litro, en otro aspecto, aproximadamente 2 a aproximadamente 20 gramos/litro, en otro aspecto, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 gramos/litro, en otro aspecto, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 gramos/litro, en otro aspecto, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 gramos/litro, y en otro aspecto, aproximadamente 4 a aproximadamente 5 gramos/litro.

En otro aspecto, el proceso es eficaz para mantener una relación calculada de concentración de CO (mM) a densidad celular (gramos/litro) de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1.0. En otro aspecto, una relación calculada de concentración de CO a densidad celular de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.9, en otro aspecto, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.8, en otro aspecto, aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.8, en otro aspecto, aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.75, en otro aspecto, de aproximadamente 0.03 a aproximadamente 0.75, y en otro aspecto, de aproximadamente 0.03 a aproximadamente 0.5.

En otro aspecto, el proceso es eficaz para mantener una relación de concentración calculada de CO (μM) a densidad celular (gramos/litro) de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1.0. En otro aspecto, una relación de concentración calculada de CO a densidad celular de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.9, en otro aspecto, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.8, en otro aspecto, aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.8, en otro aspecto, aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.75, en otro aspecto, aproximadamente 0.03 a aproximadamente 0.75, y en otro aspecto, aproximadamente 0.03 a aproximadamente 0.5.

En un aspecto, el gas de síntesis se suministra a una primera zona 200 de fermentación. Si una concentración calculada de CO en la primera zona 200 de fermentación es aproximadamente 0.12 mM o mayor, entonces se proporciona al menos una porción del gas de síntesis a la primera zona 200 de fermentación para una o más zonas de fermentación subsecuentes a través de la entrada/burbujeo de gas 122. La porción de gas de síntesis suministrada a la una o más zonas de fermentación subsiguientes proporciona una concentración calculada de CO en cualquier zona de fermentación subsecuente de aproximadamente 0.12 mM o menos, en otro aspecto, aproximadamente 0.10 mM o menos, en otro aspecto, aproximadamente 0.08 mM o menos, en otro aspecto, aproximadamente 0.06 mM o menos, en otro aspecto, aproximadamente 0.04 mM o menos, y en otro aspecto, aproximadamente 0.02 mM o menos.

El gas de síntesis puede suministrarse a cada zona de fermentación de a una por vez o puede suministrarse a una o más zonas de fermentación simultáneamente. En este aspecto, el gas de síntesis que entra en una zona de fermentación tendrá aproximadamente 20% molar o más de CO, en otro aspecto, aproximadamente 30% molar o más, en otro aspecto, aproximadamente 40% molar o más, y en otro aspecto, aproximadamente 50% molar o más.

En otro aspecto, el gas de síntesis suministrado a cualquier zona de fermentación tendrá una relación molar H_2 a CO de aproximadamente 0.2 o más, y de aproximadamente 4% molar a aproximadamente 99.9% molar de CO. En otro aspecto, el gas de síntesis que entre en cualquier zona de fermentación subsecuente tendrá una relación molar H_2 a CO de aproximadamente 0.5 o más, en otro aspecto, aproximadamente 1.0 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 3.5 o más.

Otro aspecto del diseño de un fermentador se muestra en la Figura 2. En este aspecto, el diseño incluye un primer fermentador 100 conectado en serie a fermentadores subsecuentes, tales como, por ejemplo, el segundo fermentador 102, el tercer fermentador 104 y el cuarto fermentador 106. El diseño puede incluir cualquier número de fermentadores subsecuentes de 1 a aproximadamente 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 fermentadores subsecuentes).

En un aspecto, el gas de síntesis entra en el primer fermentador 100 a través de una entrada/burbujeador 120 de gas. La dispersión del gas de síntesis y mezcla adicional se logra con al menos un impulsor 225 de dispersión de gas y al menos un impulsor 220 de mezcla que están acoplados a un eje 200 de accionamiento.

El gas 150 de síntesis puede transportarse a uno o más biorreactores posteriores. El gas 150 de síntesis se puede suministrar a cada fermentador posterior uno a la vez en serie, o se puede suministrar a uno o más fermentadores subsiguientes simultáneamente en paralelo. En este aspecto, el gas de síntesis que entra en cualquier fermentador posterior tendrá aproximadamente 20% molar o más de CO, en otro aspecto, aproximadamente 30% molar o más, en otro aspecto, aproximadamente 40% molar o más, y en otro aspecto, aproximadamente 50 moles % o más.

En otro aspecto, el gas de síntesis suministrado a cualquier fermentador posterior tendrá una relación molar H_2 a CO de aproximadamente 0.2 o más, y de aproximadamente 4% molar a aproximadamente 99.9% molar de CO. En otro aspecto, el gas sintético que entre en cualquier fermentador posterior tendrá un H_2 a una relación molar de CO de aproximadamente 0.5 o más, en otro aspecto, aproximadamente 1.0 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 3.5 o más.

En otro aspecto, se puede proporcionar un gas de escape de un primer fermentador o de cualquier otro subsiguiente a una caldera de gas de ventilación. La caldera de gas de ventilación puede utilizarse para proporcionar vapor para la producción de energía.

5 Productividad de Alcohol

Ciertas relaciones de H₂ a CO y/o de CO₂ a CO son efectivas para proporcionar STY mejorada. En este aspecto, el proceso es efectivo para proporcionar un STY (rendimiento espacio tiempo) de aproximadamente 1 gramo o más de alcohol total/(L·día). En otro aspecto, el proceso es eficaz para proporcionar un suministro de una STY de al menos aproximadamente 10 g de alcohol total/(L·día). Los posibles valores de STY incluyen aproximadamente 10 g de alcohol total/(L·día) a aproximadamente 300 g/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de alcohol total/(L·día) a aproximadamente 200 g de alcohol total/(L·Día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de alcohol total/(L·día) a aproximadamente 160 g de alcohol total/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de alcohol total/(L·día) a aproximadamente 120 g alcohol total/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de alcohol total/(L· día) a aproximadamente 80 g de alcohol total/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 20 g de alcohol total/(L·Día) a aproximadamente 140 g de alcohol total/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 20 g de alcohol total/(L·día) a aproximadamente 100 g de alcohol total/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 40 g alcohol total/(L·día) a aproximadamente 140 g de alcohol total/(L·día), y en otro aspecto, aproximadamente 40 g de alcohol total/(L·día) a aproximadamente 100 g de alcohol total/(L·día) .

Tal como se usa en el presente documento, "alcohol total" incluye etanol, butanol, propanol y metanol. En un aspecto, el alcohol total puede incluir al menos aproximadamente 80 por ciento en peso o más de etanol. En otro aspecto, el alcohol total puede incluir al menos aproximadamente 25 por ciento en peso o menos de butanol.

En un aspecto relacionado, la productividad puede expresarse como STY (rendimiento espacio tiempo expresado como g de etanol/(L·día). En este aspecto, el proceso es efectivo para proporcionar un STY (rendimiento espacio tiempo) de al menos aproximadamente 10 g de etanol/(L·día). Los posibles valores de STY incluyen aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 200 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 160 g etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 120 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 10 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 80 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 20 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 140 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 20 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 100 g de etanol/(L·día), en otro aspecto, aproximadamente 40 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 140 g de etanol/(L·día), y en otro aspecto, aproximadamente 40 g de etanol/(L·día) a aproximadamente 100 g de etanol/(L·día).

Determinación de Concentraciones de CO – Valor Calculado

Con el fin de calcular el CO disuelto, se necesita determinar el coeficiente de transferencia de masa (KLa) del sistema. El valor KLa dependerá de diversos factores, tales como la arquitectura del reactor, la tasa de flujo de gas superficial, el volumen no excitado, la temperatura y la potencia de agitación. Por lo tanto, los valores de KLa varían de las condiciones del reactor a la condición.

Ley de Henry: $P = K_H C$

Constante de Henry = $K_H = p/c$ (L (psi)/mol)
a 38 °C, $K_H = 17640$ (L (psi)/mol)

En un CSTR que contiene bacterias que consumen CO, se puede usar la siguiente ecuación para estimar el CO disuelto.

$KLa ((P_{CO}(\text{espacio de cabeza})/K_H) - (P_{CO}(\text{líquido})/K_H)) = COU$
COU = absorción de monóxido de carbono (mol/L/min)
KLa = coeficiente de transferencia de masa (min^{-1})
 $(P_{CO}(\text{líquido})/K_H) = CO \text{ disuelto (mol/L)}$

Cuando se disuelve CO = 0
 $KLa = COU / (P_{CO}(\text{espacio de cabeza})/K_H)$
 $KLa ((P_{CO}(\text{espacio de cabeza})/K_H) - (P_{CO}(\text{líquido})/K_H)) = COU$
 $K_H = L(\text{psi})/\text{mol}$

La determinación de la concentración de CO por cálculo se ilustra adicionalmente en los Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Presión parcial en el espacio superior como guía para proporcionar gas de alimentación al cultivo para evitar la inhibición de CO con Clostridium ljungdahlii utilizando un gas de alimentación de CO elevado.

Los biorreactores New Brunswick y CelliGen 310 que contenían medio de etanol 1x modificado se inocularon con 1,28 g/l de *Clostridium ljungdahlii* de crecimiento activo (en gas de síntesis). Antes de la inoculación, la tasa de agitación del reactor se ajustó a 800 rpm. Las muestras de gases y líquidos tomadas del reactor a intervalos de 1 a 4 horas se analizaron para determinar el consumo o la producción de diversos componentes de gas, la concentración de caldo de ácido acético, la concentración de caldo de etanol y la densidad óptica del cultivo. También la composición del gas de alimentación se midió diariamente y el flujo al reactor se midió en tiempo real por el controlador de flujo de masa que regulaba el gas de alimentación al reactor. Se utilizó un gas de alimentación de alta composición de CO de 95% de CO/5% de N₂.

El siguiente método se usó para regular la tasa de alimentación de gas al reactor:

$$X = (\% \text{ de CO de espacio de cabeza} / 100) \times (((\text{presión del reactor medida (psig)} + \text{presión atmosférica})) / (\text{presión atmosférica} (14.7)))$$

si x es 0.08 o menor, el flujo de gas al reactor se incrementó en 7.6% del valor molar actual de la tasa de flujo de gas al reactor

si X es 0.12 o mayor, el flujo de gas al reactor disminuyó en 7.6% del valor molar actual de la tasa de flujo de gas al reactor

El método fue efectivo para mantener el CO disuelto en el caldo de cultivo por debajo de 0.12 mmol/L a aproximadamente de 37 a 38 °C. Como se muestra en la Figura 3, la masa celular aumentó con el tiempo y alcanzó 8.24 g/l de masa celular dentro de las 41.4 horas posteriores a la inoculación del reactor. En este punto, el cultivo producía más de 12 g/l de etanol.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 para medir las concentraciones de caldo de etanol y ácido acético. El cromatógrafo de gases SRI 8610c se usó para medir los componentes del gas de alimentación.

Ejemplo 2: presión parcial en el espacio de cabeza como guía para proporcionar gas de alimentación al cultivo para evitar la inhibición de CO con *Butyribacterium methylothrophicum* usando un alto gas de alimentación de CO.

El reactor New Brunswick y CelliGen 310 que contenía medio de etanol 1x modificado se inoculó con 0.92 g/l de *Butyribacterium methylothrophicum* de crecimiento activo (en gas de síntesis). Antes de la inoculación, la tasa de agitación del reactor se ajustó a 800 rpm. Las muestras de gases y líquidos tomadas del reactor a intervalos de 1 a 4 horas se analizaron para determinar el consumo o la producción de diversos componentes del gas, la concentración de caldo de ácido acético, la concentración de caldo de etanol y la densidad óptica del cultivo. También la composición del gas de alimentación se midió diariamente y el flujo al reactor se midió en tiempo real por el controlador de flujo de masa que regulaba el gas de alimentación al reactor. Se utilizó un gas de alimentación de alta composición de CO de 95% de CO/5% de N₂.

El método descrito en el Ejemplo 1 se usó para regular la tasa de suministro de gas al reactor.

Como se muestra en la Figura 4, la masa celular aumentó con el tiempo y alcanzó 7.88 g/l de masa celular dentro de las 68 horas después de la inoculación del reactor. En este punto, el cultivo estaba produciendo 5 g/l de etanol.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 para medir las concentraciones de caldo de etanol y ácido acético. El cromatógrafo de gases SRI 8610c se usó para medir los componentes del gas de alimentación.

Ejemplo 3: Uso de bajo gas de alimentación de CO al cultivo para evitar la inhibición de CO con *Clostridium ljungdahlii* usando un bajo gas de alimentación de CO.

El reactor New Brunswick y CelliGen 310 que contenía medio de etanol 1x modificado se inoculó con 0.38 g/l de *Clostridium ljungdahlii* de crecimiento activo (en gas de síntesis). Antes de la inoculación, la tasa de agitación del reactor se ajustó a 800 rpm. Las muestras de gases y líquidos tomadas del reactor a intervalos de 1 a 4 horas se analizaron para determinar el consumo o la producción de diversos componentes del gas, la concentración de caldo de ácido acético, la concentración de caldo de etanol y la densidad óptica del cultivo. También la composición del gas de alimentación se midió diariamente y el flujo al reactor se midió en tiempo real por el controlador de flujo de masa que regulaba el gas de alimentación al reactor.

Se utilizó un gas de alimentación de composición de CO de 9.5% de CO/90.5% de N₂ y el flujo se ajustó a 534 ml/min. Durante todo el experimento, no se ajustó la tasa del gas de alimentación al reactor.

El método se utilizó para mantener el CO disuelto en el caldo de cultivo por debajo de 0.12 mmol/l a aproximadamente de 37 a 38 °C. De acuerdo con la Ley de Henry, la concentración máxima de CO disuelto que se puede obtener al alimentar un gas que contiene 9.5% es 0.079 mmol.

Como se muestra en la Figura 5, la masa celular aumentó con el tiempo y alcanzó 6.21 g/l de masa celular dentro de las 90.6 horas después de la inoculación del reactor. En este punto, el cultivo producía más de 5 g/l de etanol.

5 Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 para medir las concentraciones de caldo de etanol y ácido acético. El cromatógrafo de gases SRI 8610c se usó para medir los componentes del gas de alimentación.

Ejemplo 4: Uso de bajo gas de alimentación de CO para evitar la inhibición de CO con *Butyribacterium methylotrophicum* usando un bajo gas de alimentación de CO.

10 El reactor New Brunswick y CelliGen 310 que contenía medio de etanol 1x modificado se inoculó con 0.86 g/l de *Butyribacterium methylotrophicum* de crecimiento activo (en 5% de CO/95% de N₂). Al comienzo del experimento, la tasa de agitación del reactor se ajustó a 800 rpm. Las muestras de gases y líquidos tomadas del reactor a intervalos de 1 a 4 horas se analizaron para determinar el consumo o la producción de diversos componentes del gas, la concentración de caldo de ácido acético, la concentración de caldo de etanol y la densidad óptica del cultivo.
15 También la composición del gas de alimentación se midió diariamente y el flujo al reactor se midió en tiempo real por el controlador de flujo de masa que regulaba el gas de alimentación al reactor.

20 Se utilizó un gas de alimentación de composición de CO de 9.5% de CO/90.5% de N₂ y el flujo se ajustó a 534 ml/min. Durante todo el experimento, no se ajustó la tasa del gas de alimentación al reactor.

Este método se utilizó para mantener el CO disuelto en el caldo de cultivo por debajo de 0.12 mmol/l a aproximadamente de 37 a 38 °C. De acuerdo con la ley de Henry, la concentración máxima de CO disuelto que puede obtenerse alimentando un gas que contiene 9.5% es 0.079 mmol.

25 Como se muestra en la Figura 6, la masa celular aumentó con el tiempo y alcanzó 3.32 g/l de masa celular dentro de las 44,4 horas después de la inoculación del reactor. En este punto, el cultivo estaba produciendo 3.7 g/l de etanol.

30 Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 para medir las concentraciones de caldo de etanol y ácido acético. El cromatógrafo de gases SRI 8610c se usó para medir los componentes del gas de alimentación.

Ejemplo 5: Efecto de las tasas de alimentación de CO en la conversión de CO

35 Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* y se mantuvo utilizando solo CO y N₂ (gas de alimentación) en un biorreactor (New Brunswick BioFlo I o IIc). Durante el experimento, la tasa del gas de alimentación se alteró para obtener las conversiones de cultivo deseadas. Se emplearon conversiones de cultivo más bajas para proporcionar un exceso de CO disuelto a *Clostridium ljungdahlii*.

40 Se usaron bajas conversiones de cultivo de CO como método para proporcionar exceso de CO disuelto al cultivo. Por ejemplo, cuando un cultivo en un reactor puede convertir una cantidad X de CO en una agitación dada y en una tasa de flujo dada, el CO disuelto se puede aumentar al incrementar la tasa de flujo de modo que las conversiones de cultivo sean inferiores a X.

45 Con aproximadamente un 80% de conversiones de CO, *Clostridium ljungdahlii* no muestra signos de inhibición como se determina a través de la producción de etanol y ácido acético, la absorción específica de CO (SCU), la cantidad de masa celular y la morfología celular. *Clostridium ljungdahlii* se inhibió a medida que se aumentó el gas de alimentación para mantener las conversiones de CO por debajo de aproximadamente 70%. El cultivo se mantuvo a niveles bajos de ácido acético (<0.4 g/l) durante al menos 8 días. Cuando las conversiones de CO volvieron a aproximadamente el 80%, la producción de etanol, la masa celular y la morfología típica volvieron a niveles de cultivo sanos. Los resultados se ilustran en la Figura 7.

50 Ejemplo 6: Tasas de alimentación de CO inhibitorias

Se cultivó *Clostridium ljungdahlii* en un biorreactor (New Brunswick BioFlo I o IIc).

55 Para lograr una conductividad de 9 mS/cm, se fabricó un medio utilizando 1.5X de todos los componentes excepto las vitaminas. Se usó un protocolo de cuatro etapas de la siguiente manera:

60 Etapa 1: se cultivó un cultivo en un biorreactor de 2 l utilizando gas de síntesis. Con una densidad celular de 2.9 g/l, la fuente de gas se cambió de la mezcla de gas de síntesis a una mezcla de CO/N₂ que contiene 95% de CO y 5% de N₂.

Etapa 2: en T = 26 horas, se estableció un objetivo de conversión de CO en > 90%.

65 Etapa 3: a T = 70 h, el objetivo de conversión de CO disminuyó de 90% a 85%.

Etapa 4: En T = 97 h, el objetivo de conversión de CO disminuyó de 85% a 80%.

El CO disuelto se calculó para cada muestra de gas usando valores representativos de KLa para una tasa de flujo particular de gas. Estos valores se promediaron para encontrar un valor representativo para cada etapa. Se tomaron fotografías durante todo el experimento para estudiar cualitativamente el cambio morfológico a lo largo del tiempo.

5 La composición y las concentraciones (μM) de cóctel vitamínico proporcionado al cultivo fueron los siguientes:

Biotina: 0.081863

Pantotenato de calcio: 0.115176

10

Tiamina: 0.148249

Este cóctel vitamínico se proporcionó al cultivo a una tasa de aproximadamente 0.12 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gramo}$ de células en el cultivo.

15

Las concentraciones de CO fueron las siguientes:

	Etapa 2:	Etapa 3:	Etapa 4:
CO promedio disuelto (Desviación estándar)	0.04 mmol (0.0520)	0.12 mmol (0.0366)	0.29 mmol (0.1102)
Promedio de SCU	0.581 mmol/g/min	0.559 mmol/g/min	0.360 mmol/g/min
Promedio de CRT	23.74 horas	31.89 horas	75.92 horas
El tiempo de retención celular promedio (CRT) se calculó para el período de 18 horas después del comienzo de cada etapa hasta el final de cada etapa.			

20 El cultivo llegó a un estado estable en la Etapa 1. El objetivo de la 2da etapa fue mantener bajo el nivel de CO disuelto manteniendo las conversiones altas (> 90%). Aunque el promedio de CO disuelto en esta etapa fue de 0.0428 mmol/l, hubo períodos hacia la segunda mitad de esta etapa donde el CO disuelto fue tan alto como 0.14 a 0.17 mmol/l. Estos picos de CO de alta disolución coinciden con los incrementos de la tasa de flujo de gas al reactor.

25 El objetivo de la Etapa 3 era obtener un incremento escalonado de CO disuelto en el reactor manteniendo un nivel más bajo de conversión bacteriana de CO. En esta etapa, la tasa de flujo de gas al reactor se ajustó para mantener la conversión del cultivo aproximadamente del 85%. Con los ajustes anteriores a la tasa de flujo de gas, el CO promedio disuelto del reactor se aumentó a 0.1221 mmol en el reactor. Aproximadamente del 40 al 50% de las bacterias desfiguradas se detectaron a lo largo de esta etapa.

30 En la etapa 4, se obtuvo un incremento adicional del CO disuelto promedio ajustando la tasa de flujo de gas al reactor para mantener las conversiones bacterianas aproximadamente del 80%. El CO disuelto promedio en esta etapa fue 0.2892 mmol. Sin embargo, el CO disuelto en el reactor en esta etapa incluía un gradiente de concentración. El CO disuelto en el reactor aumentó a aproximadamente 0.2 mmol una vez que las conversiones comenzaron a bajar al 80%. En este punto, la absorción bacteriana específica de CO (metabolismo) siguió una
35 tendencia a la baja. Esta tendencia a la baja del metabolismo es indicativa de que las bacterias entran en una fase de retroalimentación negativa. Por ejemplo, después de un cierto punto de umbral, el metabolismo bacteriano comenzó a inhibirse, esta inhibición inicial puede haber reducido el umbral inhibitorio de la concentración de CO disuelto más abajo y causar una mayor inhibición en el metabolismo bacteriano.

40 Ejemplo 7: Efecto de la concentración de CO en el crecimiento

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

45 La conductividad del cultivo se ajustó ajustando la resistencia del medio de crecimiento, por ejemplo la concentración de todos los componentes, excepto que la vitamina en el medio de crecimiento se aumentó en 1.5 veces para aumentar la conductividad del cultivo de aproximadamente 7 mS a aproximadamente 9.5 mS.

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

50 La tasa de flujo de gas inicial de cada experimento se mantuvo sin cambios a lo largo del experimento. Los parámetros del reactor, cuando los valores de conversión de CO alcanzan una meseta después de una puesta en marcha exitosa, se usaron para calcular KLa para condiciones relevantes.

La composición del gas de síntesis fue de 30% de CO, 15% de H₂, 10% de CO₂ y 45% de N₂.

55

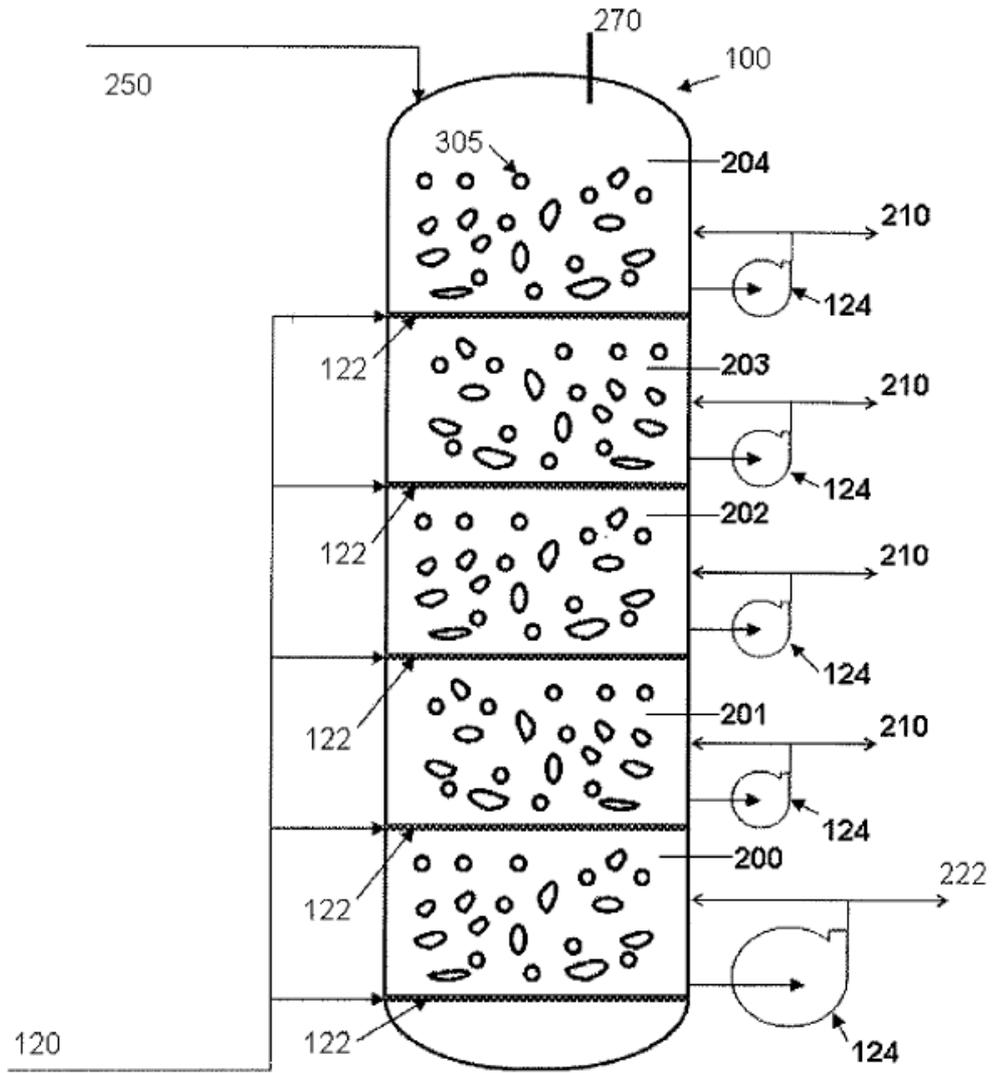
- 5 Ejecución del biorreactor #1: se usó un medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 25 ml/min en este experimento. Como se muestra en la Figura 8, después de un período de espera inicial de aproximadamente 20 horas, las bacterias comenzaron a multiplicarse a un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.08 mmol en el caldo del reactor. (D CO: concentración de CO disuelta en el caldo del reactor, CD: densidad celular, absorción de CO específica de SCU).
- 10 Ejecución del biorreactor #2: se usó un medio de crecimiento 1x y 35 ml/min de tasa de alimentación de gas de síntesis en este experimento. Como se muestra en la Figura 9, después de un período de espera inicial de aproximadamente 36 horas, las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.22 mmol en el caldo del reactor. Aproximadamente 51 horas después de la inoculación, las células se volvieron alargadas y curvadas.
- 15 Ejecución del biorreactor #3: se usó un medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 40 ml/min en este experimento. Como se muestra en la Figura 10, después del periodo de espera inicial de aproximadamente 45 horas, las bacterias comenzaron a multiplicarse a un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.22 mmol en el caldo del reactor. Aproximadamente 51 horas después de la inoculación, las células se volvieron alargadas y curvadas.
- 20 Ejecución del biorreactor #4: se utilizó un medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 45 ml/min en este experimento. Como se muestra en la Figura 11, después del período de espera inicial de aproximadamente 50 horas, las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.17 mmoles en el caldo del reactor. Aproximadamente 55 horas después de la inoculación, las células se volvieron alargadas y curvadas.
- 25 Ejecución del biorreactor #5: se usó un medio de crecimiento 1x y tasa de alimentación de gas de síntesis de 50 ml/min en este experimento. Como se muestra en la Figura 12, el cultivo continuó en espera incluso a aproximadamente 70 horas después de la inoculación. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente de 0,23 mmol en el caldo del reactor.
- 30 Ejecución del biorreactor #6: se utilizó un medio de crecimiento 1x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 50 ml/min en este experimento. Este experimento se inició con un mayor inóculo de bacterias en comparación con todos los experimentos anteriores (4.8 versus células de 3.8 g/l). Como se muestra en la Figura 13, después de un período de espera inicial de aproximadamente 10 horas, las bacterias comenzaron a multiplicarse en un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas. El CO disuelto máximo calculado fue aproximadamente 0.12 mmoles en el caldo del reactor. Aproximadamente 20 horas después de la inoculación, la morfología celular fue corta y de naturaleza consistente.
- 35 Ejecución del biorreactor #7: se utilizó un medio de crecimiento de 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 45 ml/min en este experimento. Este experimento se inició con un inóculo de 3.8 g/l de bacterias. Como se muestra en la Figura 14, la densidad de células bacterianas disminuyó con el tiempo. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.25 mmol en el caldo del reactor.
- 40 Ejecución del biorreactor #8: se utilizó un medio de crecimiento de 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 35 ml/min en este experimento. Este experimento se inició con un inóculo de 3.8 g/l de bacterias. Como se muestra en la Figura 15, la densidad de células bacterianas disminuyó con el tiempo. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.22 mmol en el caldo del reactor.
- 45 Ejecución del biorreactor #9: se utilizó un medio de crecimiento de 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 30 ml/min en este experimento. Este experimento se inició con un inóculo de 3.8 g/l de bacterias. Como se muestra en la Figura 16, la densidad de células bacterianas disminuyó con el tiempo. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.22 mmol en el caldo del reactor.
- 50 Ejecución del biorreactor #10: se usó un medio de crecimiento de 1.5x y una tasa de alimentación de gas de síntesis de 20 ml/min en este experimento. Este experimento se inició con un inóculo de 3.8 g/l de bacterias. Como se muestra en la Figura 17, la densidad de células bacterianas aumentó con el tiempo y logró un tiempo de duplicación de 20 horas. El CO disuelto máximo calculado fue de aproximadamente 0.022 mmol en el caldo del reactor.
- 55 Si bien la invención aquí divulgada se ha descrito por medio de realizaciones, ejemplos y aplicaciones específicos de la misma, los expertos en la técnica podrían realizar numerosas modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones.
- 60

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de fermentación de gas de síntesis que comprende:
- 5 proporcionar una primera zona de fermentación y una o más zonas de fermentación subsecuentes;
- suministrar gas de síntesis a cada zona de fermentación de una en una o simultáneamente a una o más zonas de fermentación y fermentar el gas de síntesis utilizando bacterias acetogénicas; en donde el proceso comprende además:
- 10 proporcionar gas de síntesis a la primera zona de fermentación;
- fermentar el gas de síntesis; y
- 15 determinar una concentración de CO en el medio de fermentación en la primera zona de fermentación,
- en donde si la concentración de CO en el medio de fermentación en la primera zona de fermentación tiene un valor calculado de 0.12 mM o mayor, entonces al menos una porción del gas de síntesis que está siendo proporcionado a la primera zona de fermentación se proporciona a una o más zonas de fermentación subsiguientes en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración calculada de CO en cualquier zona de fermentación subsecuente de 0.12 mM o menos, y
- 20 en donde la concentración de CO se calcula determinando un factor de suministro, en donde el factor de suministro = (% de CO de espacio de cabeza ÷ 100) x (((presión del reactor medida (psig) + presión atmosférica)) ÷ (presión atmosférica x 14.7)).
- 25
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el proceso proporciona una concentración calculada de CO a una relación de densidad celular inicial de 0.5 a 0.9.
- 30
3. El proceso de fermentación de gas de síntesis de la reivindicación 1, en donde la primera zona de fermentación es un primer fermentador y la una o más zonas de fermentación subsecuentes son uno o más fermentadores subsecuentes.
- 35
4. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el gas de síntesis proporcionado a la primera o cualquier zona de fermentación/fermentador subsecuente tiene una relación molar de H₂ a CO de 0.2 o más.
- 40
5. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el gas de síntesis proporcionado a la primera o cualquier zona de fermentación/fermentador subsecuente tiene 40 por ciento molar o más de CO más H₂ y un contenido de H₂ de 30 por ciento molar o menos.
- 45
6. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el gas de síntesis proporcionado a la primera o cualquier zona de fermentación/fermentador subsecuente tiene una relación molar CO/CO₂ de al menos 0.75.
7. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el proceso es efectivo para aumentar la densidad celular a 2.0 g/l o más en la primera o en cualquier zona de fermentación/fermentador subsecuente.
- 50
8. El proceso de la reivindicación 3, en donde el proceso es efectivo para mantener una relación de concentración calculada de CO a densidad celular de 0.001 a 1.0.
- 55
9. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3 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 producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter 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 los mismos.
- 60
- 65

10. El proceso de la reivindicación 3, en donde se proporciona gas de síntesis a fermentadores subsecuentes que funcionan en paralelo
- 5 11. El proceso de la reivindicación 3, en el que se proporciona gas de síntesis a fermentadores subsecuentes que funcionan en serie.
12. El proceso de la reivindicación 3, en donde al menos una porción de gas de escape procedente de un primer fermentador o de cualquier otro subsecuente se proporciona a una caldera de gas de ventilación.

FIG. 1



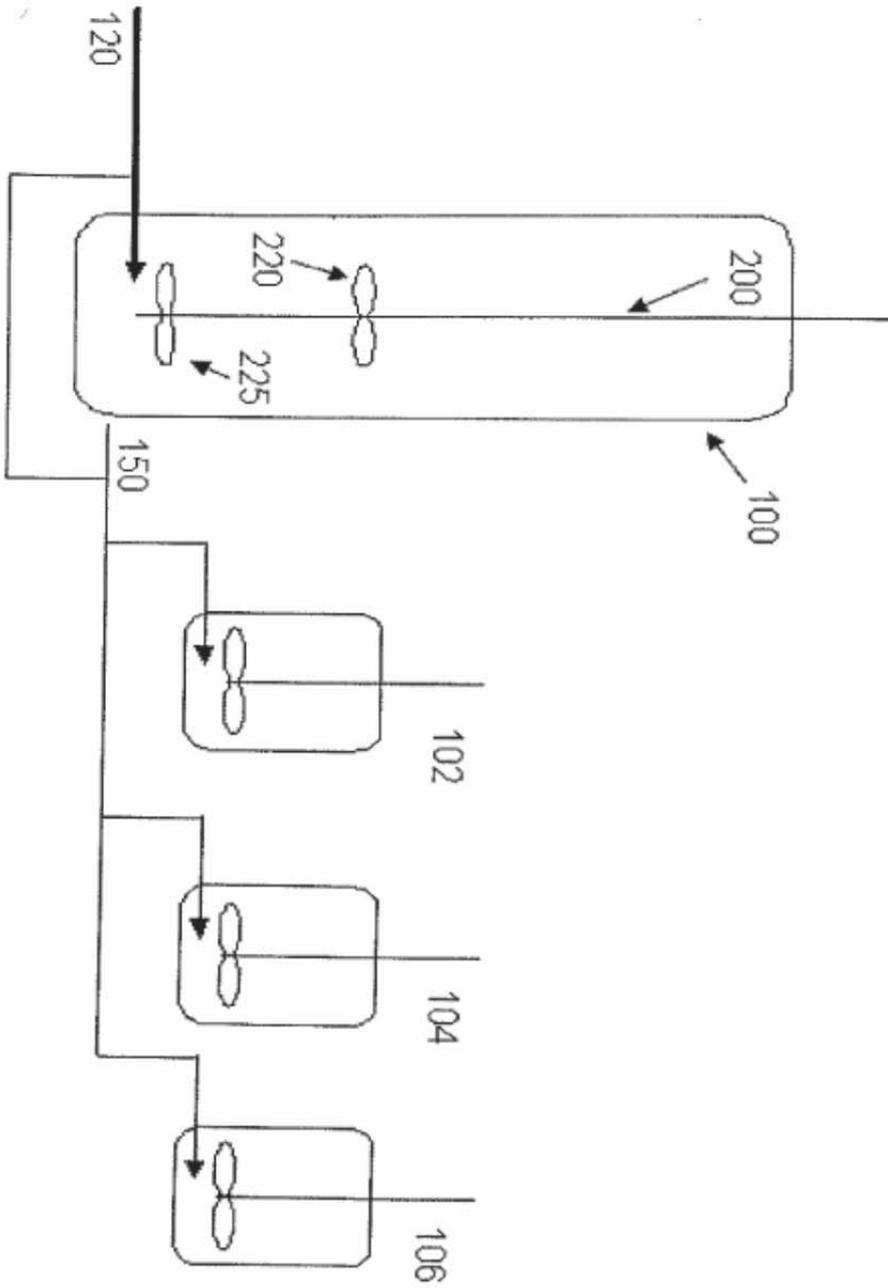


FIG. 2

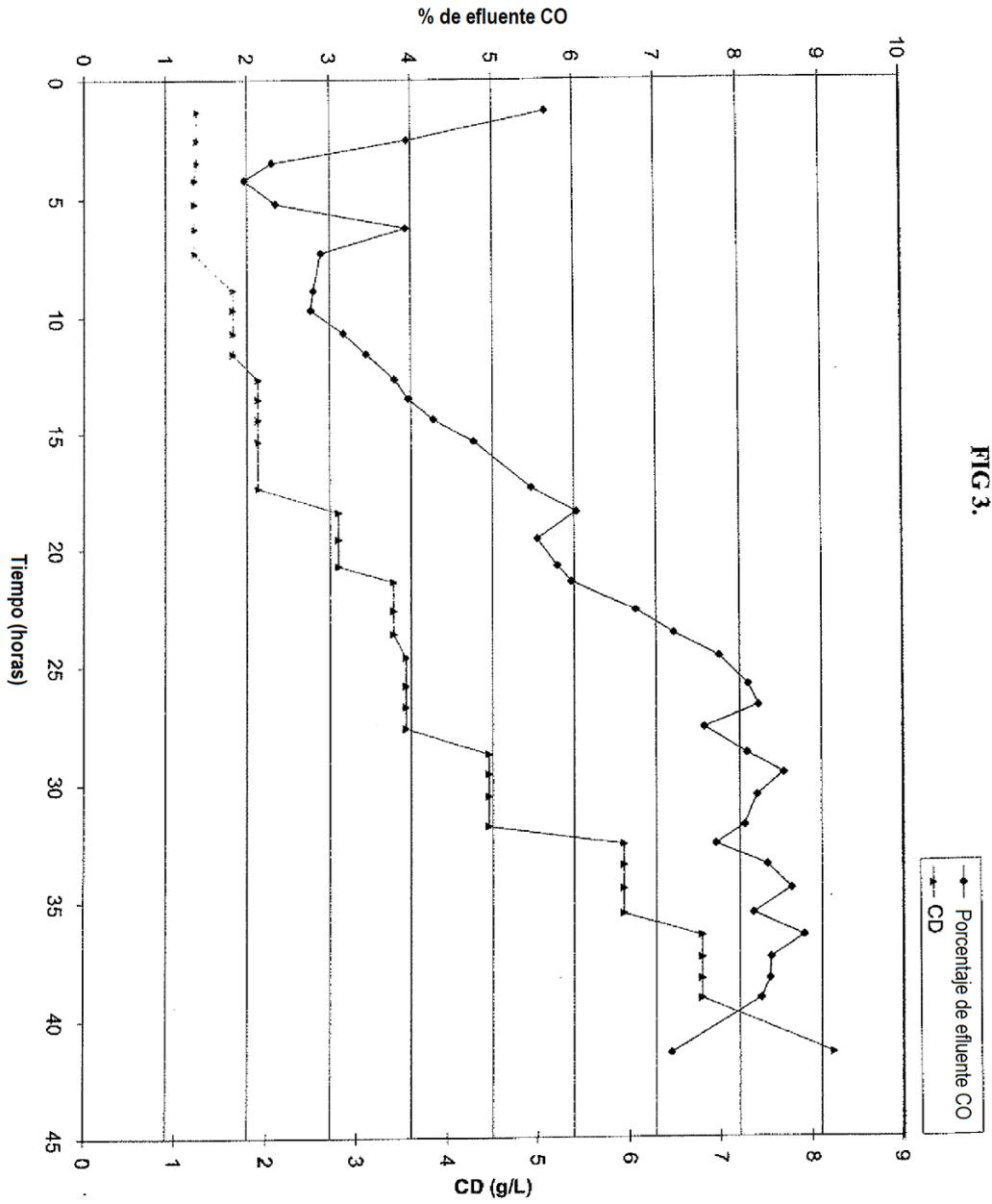


FIG. 3.

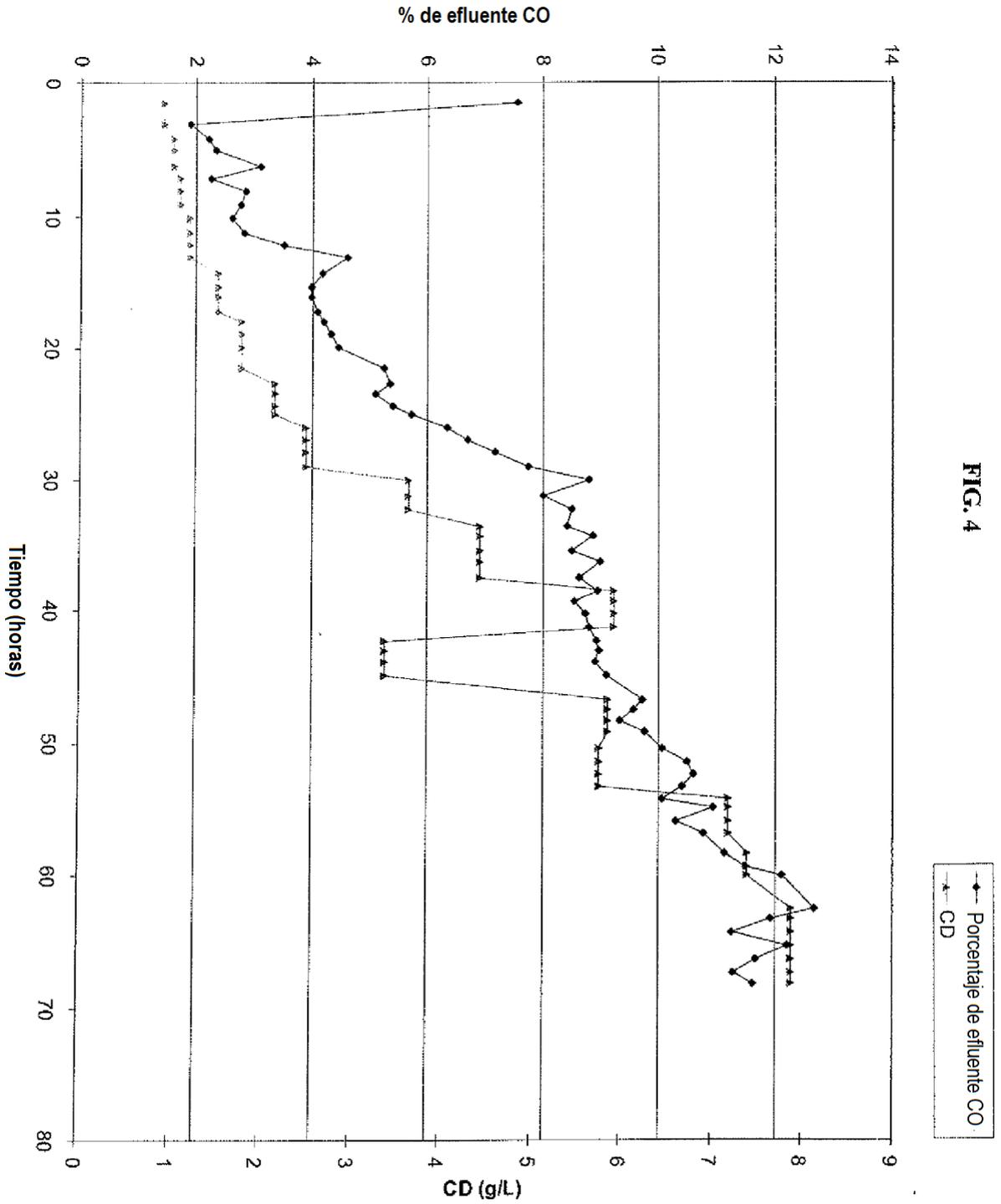


FIG. 4

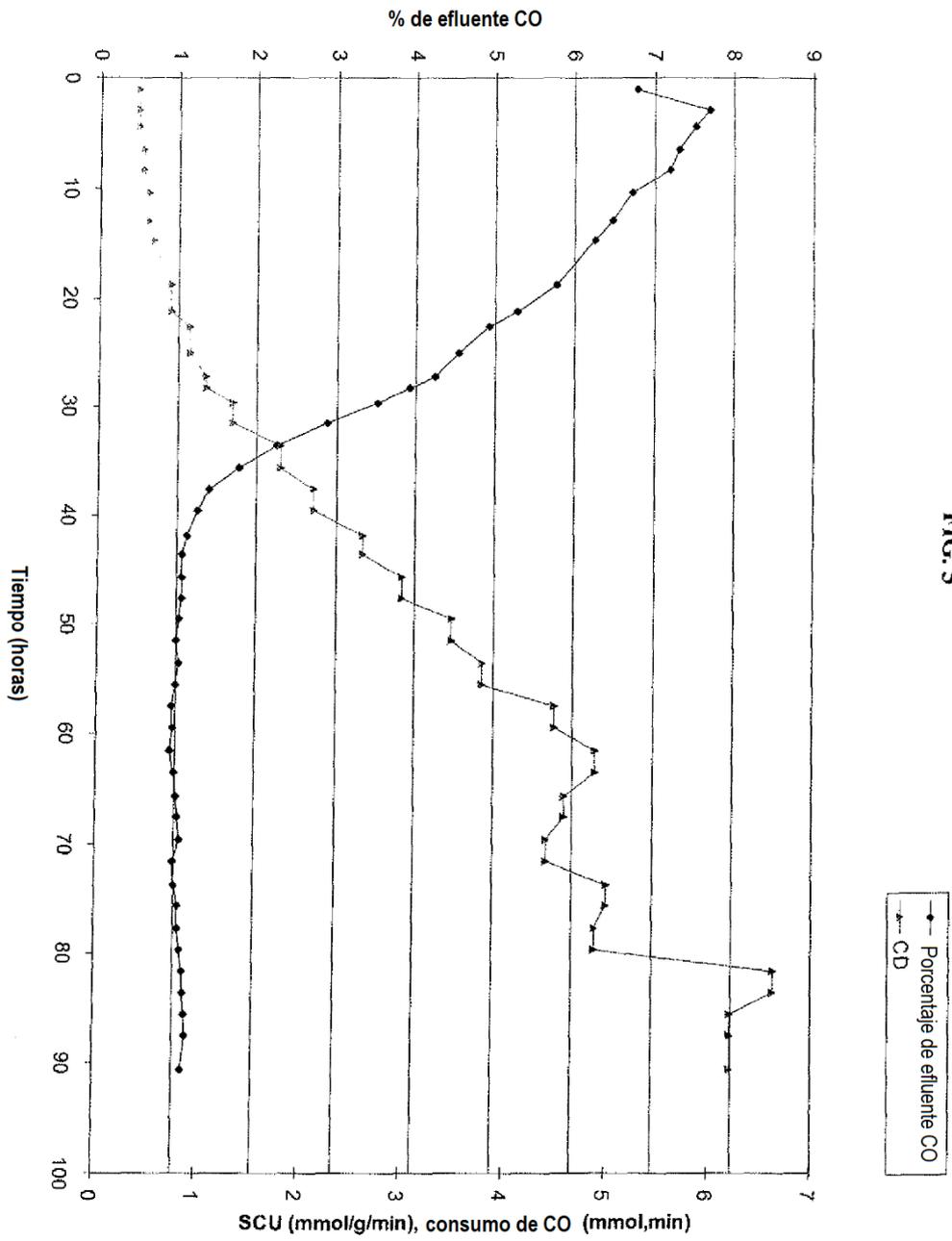


FIG. 5

—●— Porcentaje de efluente CO
 -▲- CD

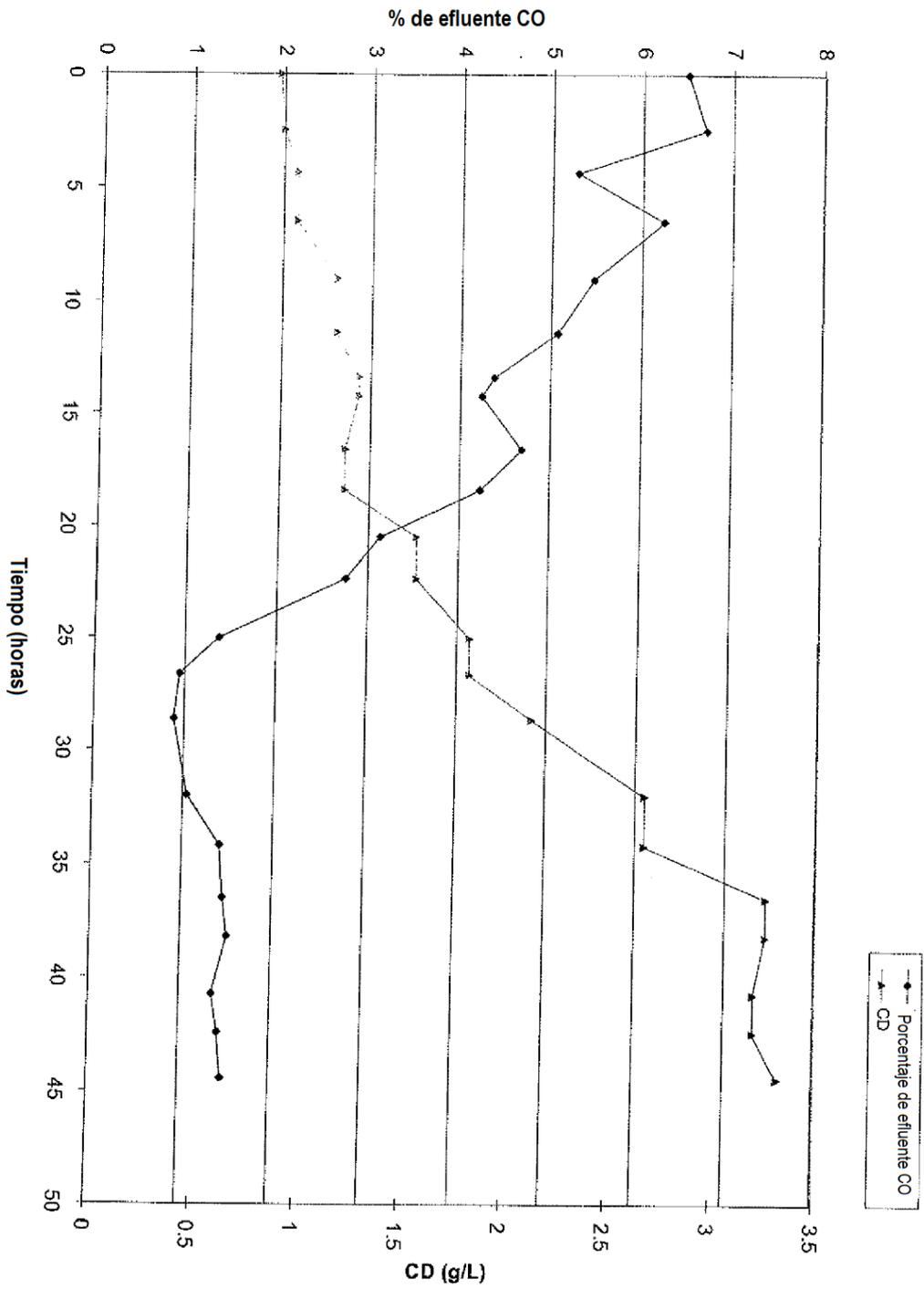


FIG. 6

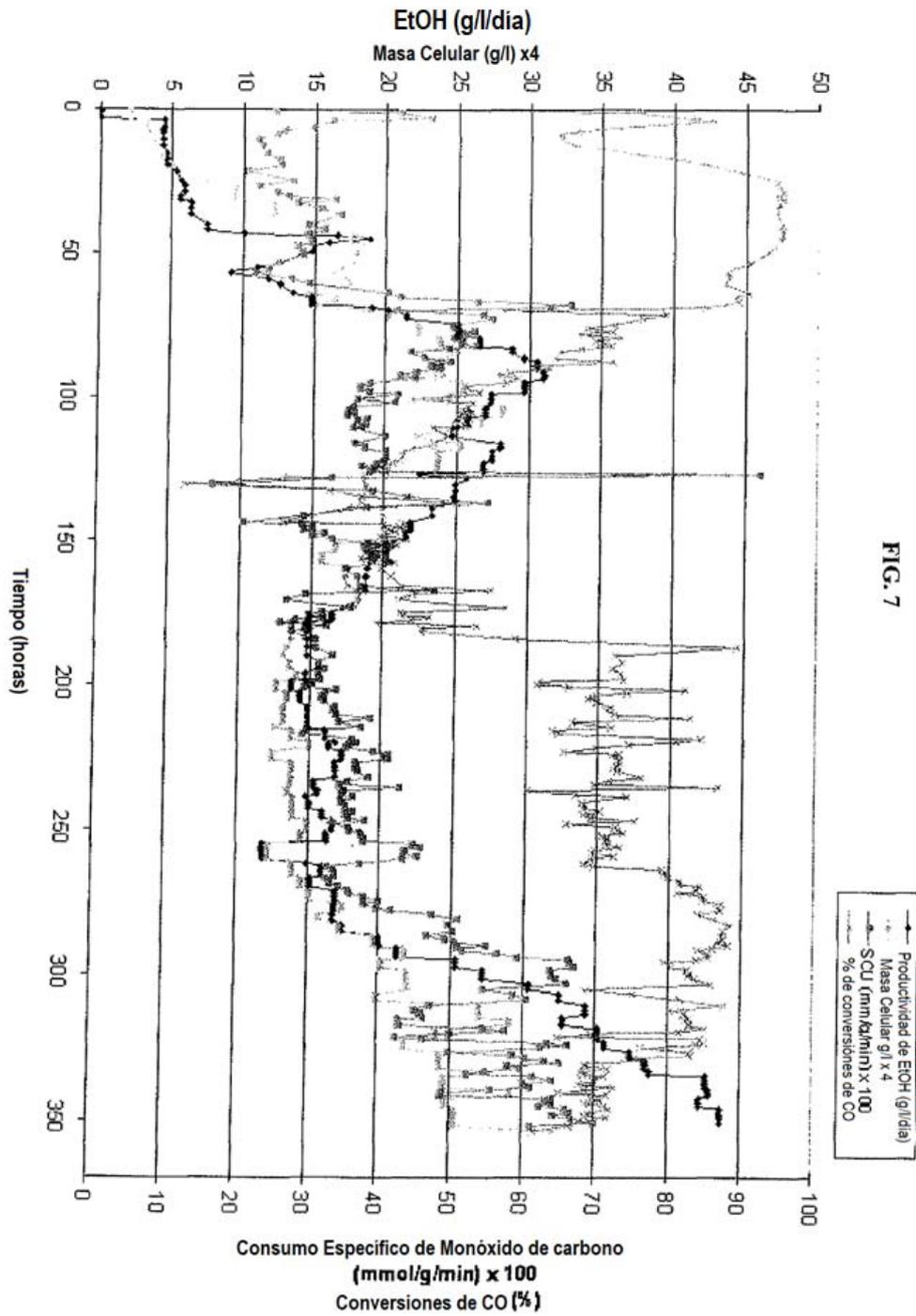


FIG. 7

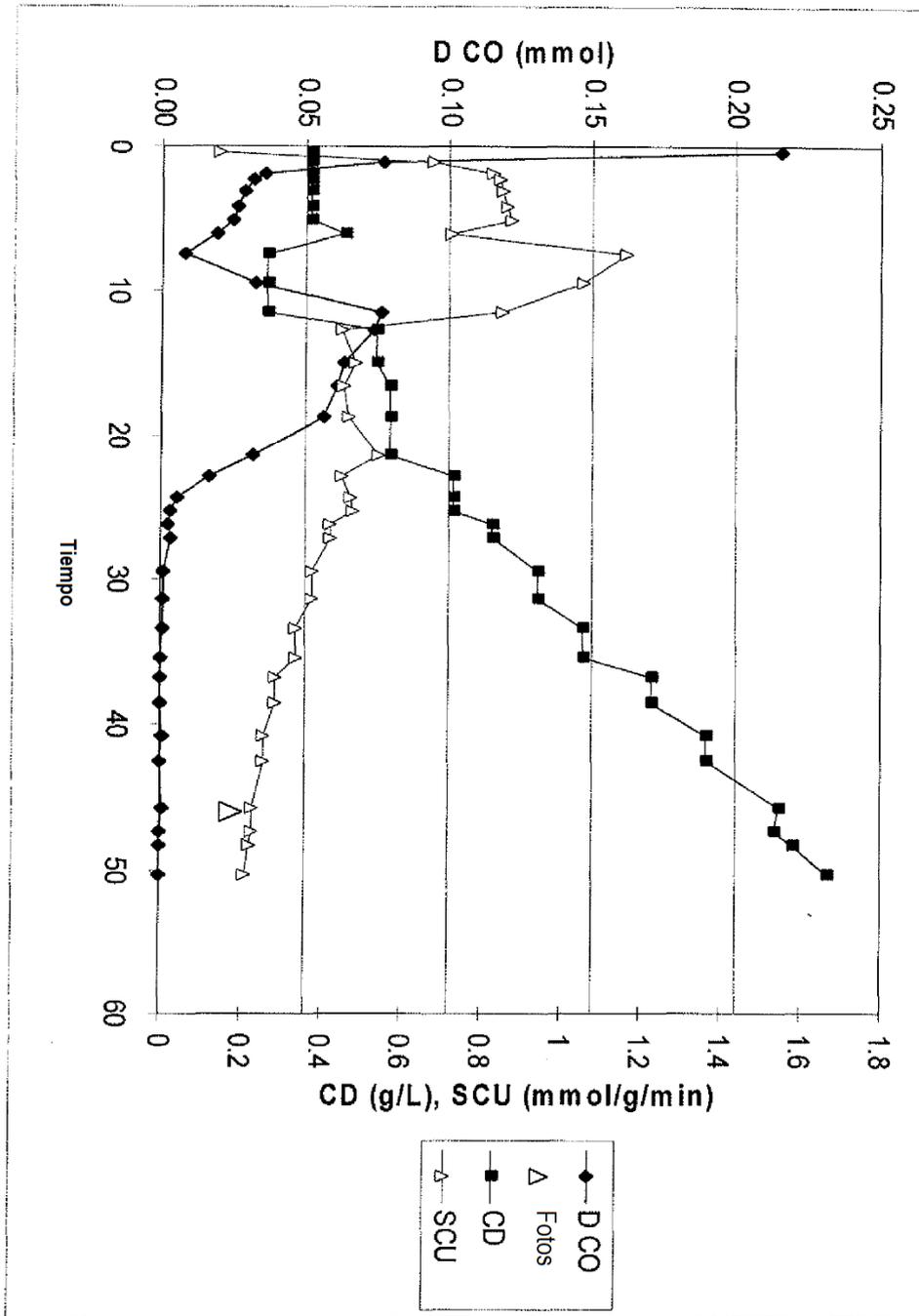


FIG. 8

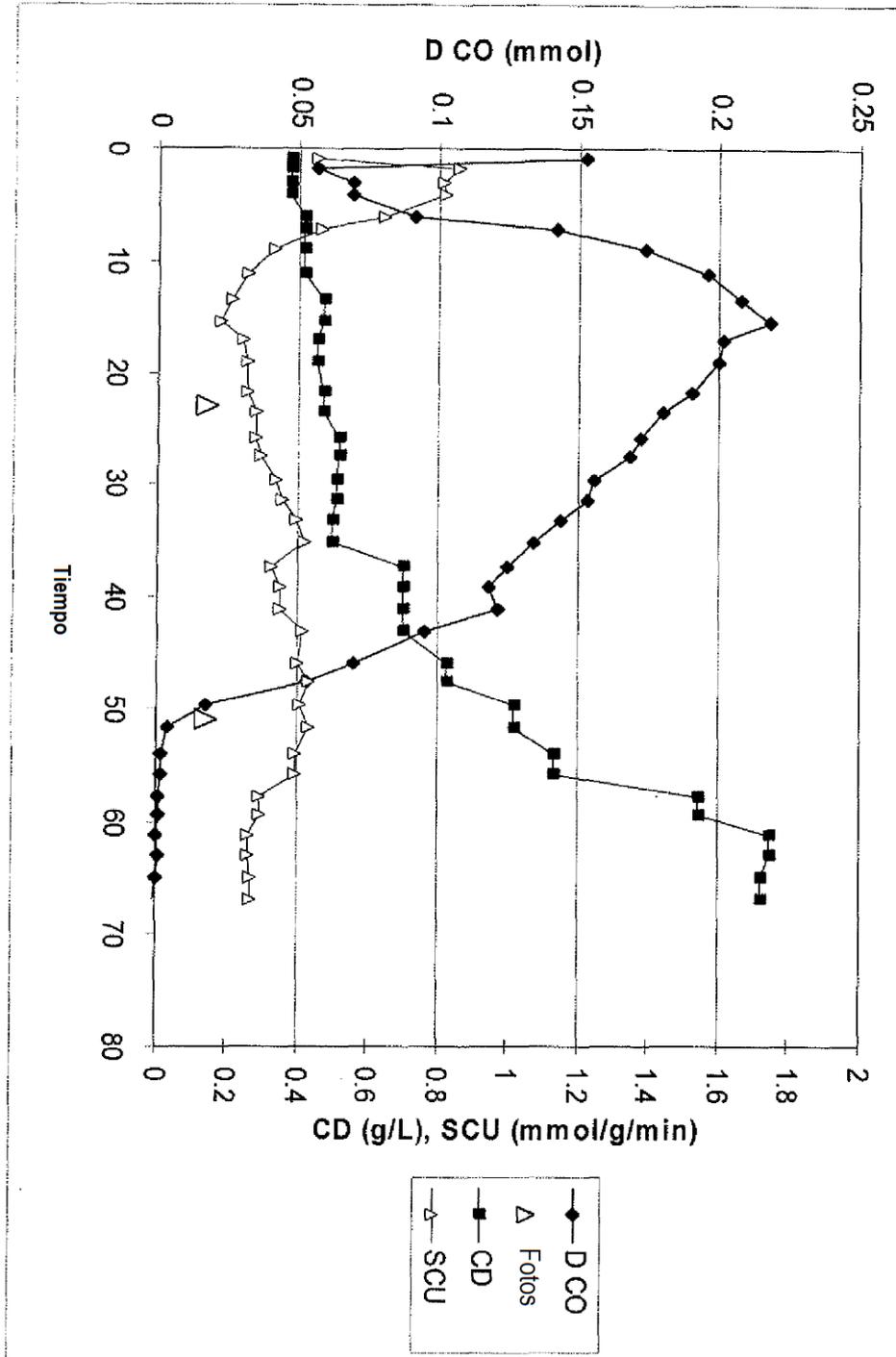


FIG. 9

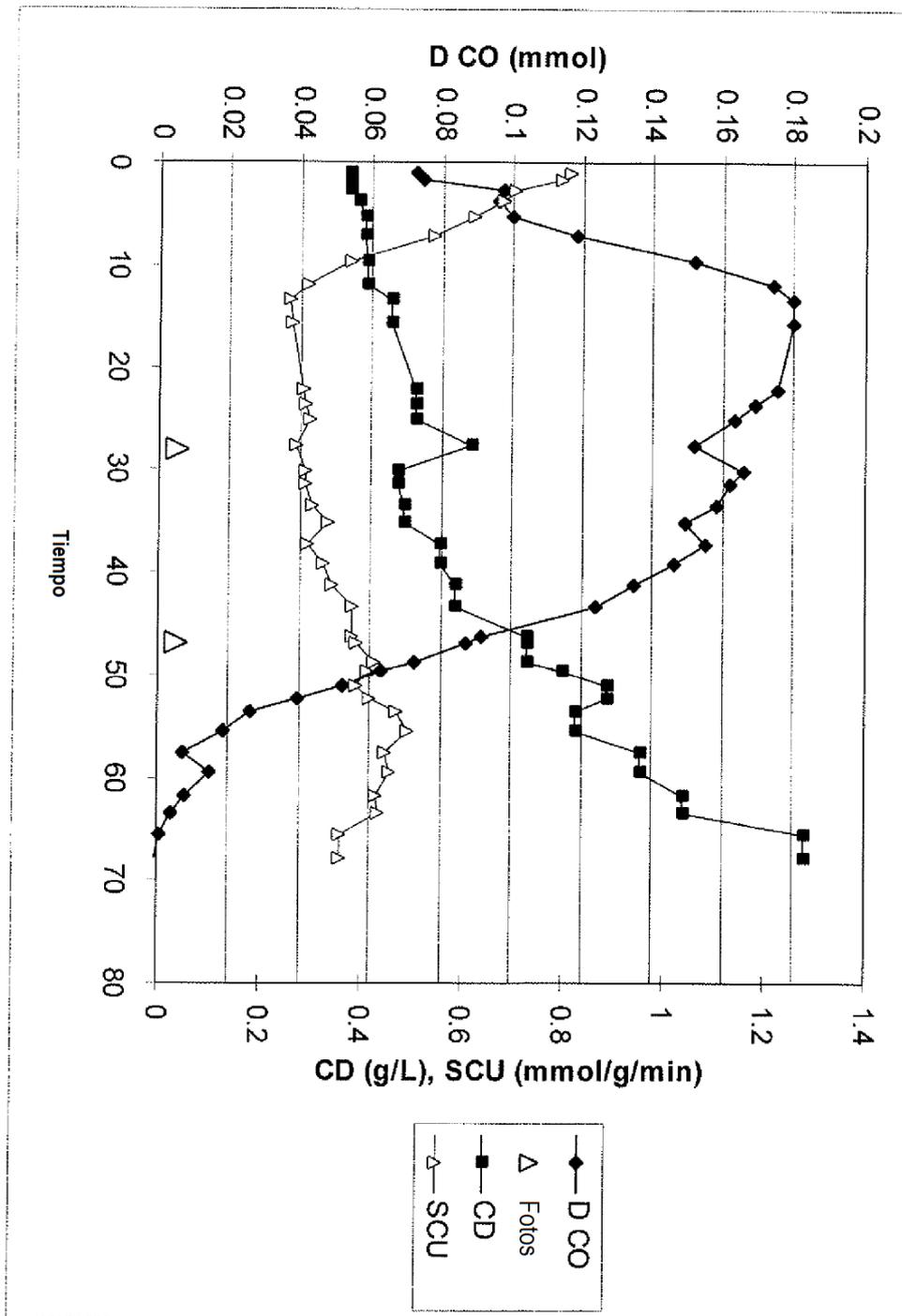


FIG 10

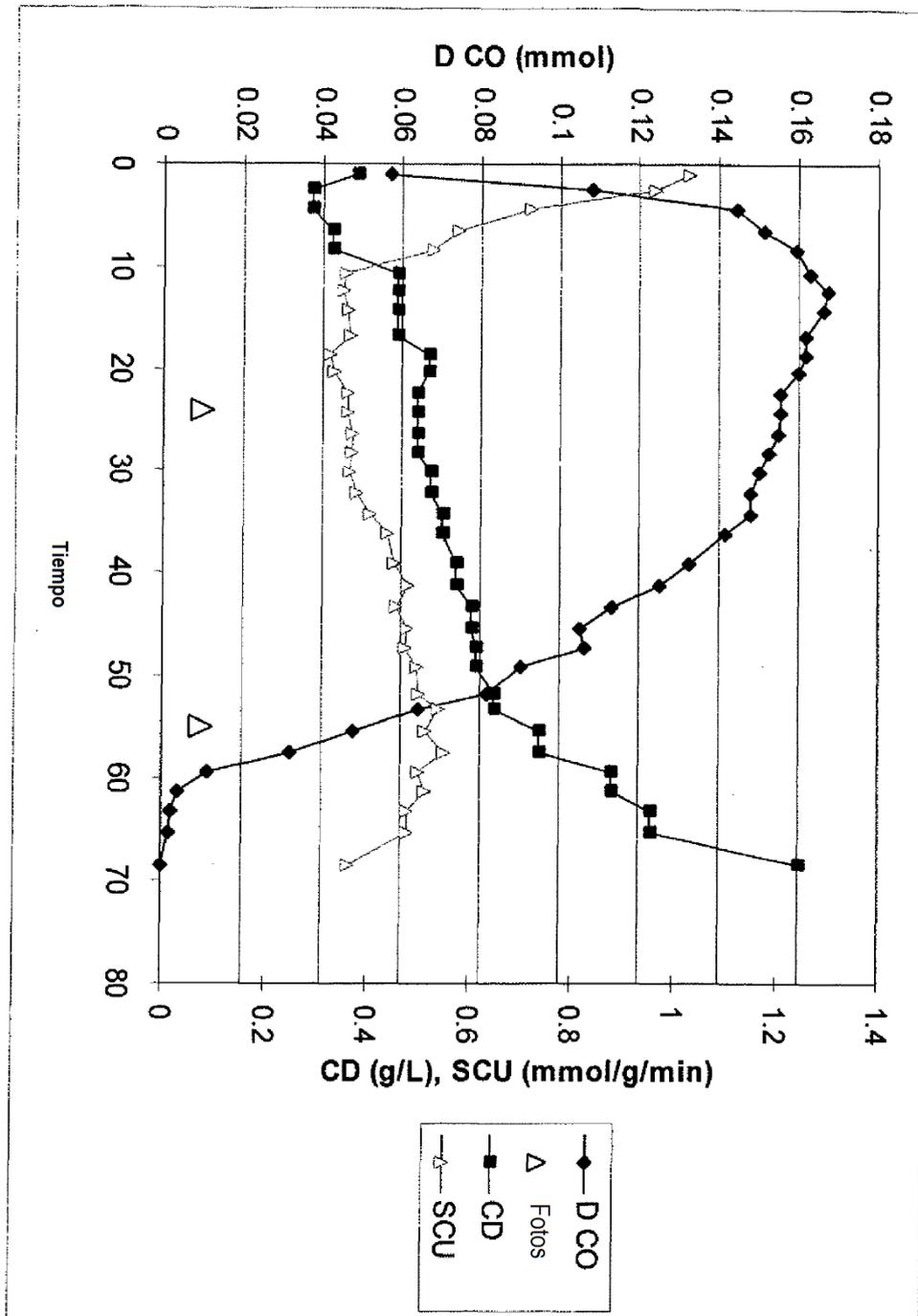


FIG. 11

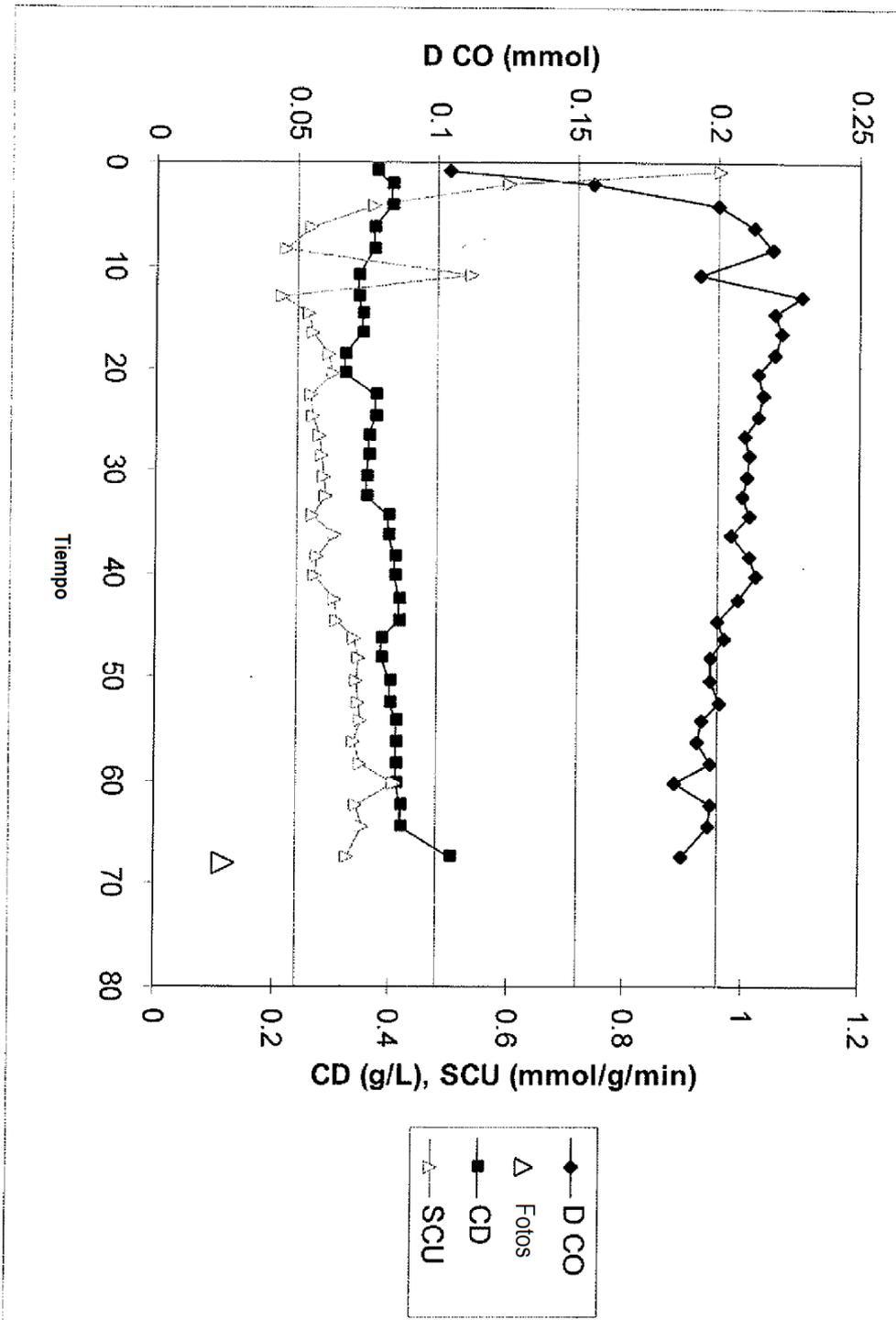


FIG. 12

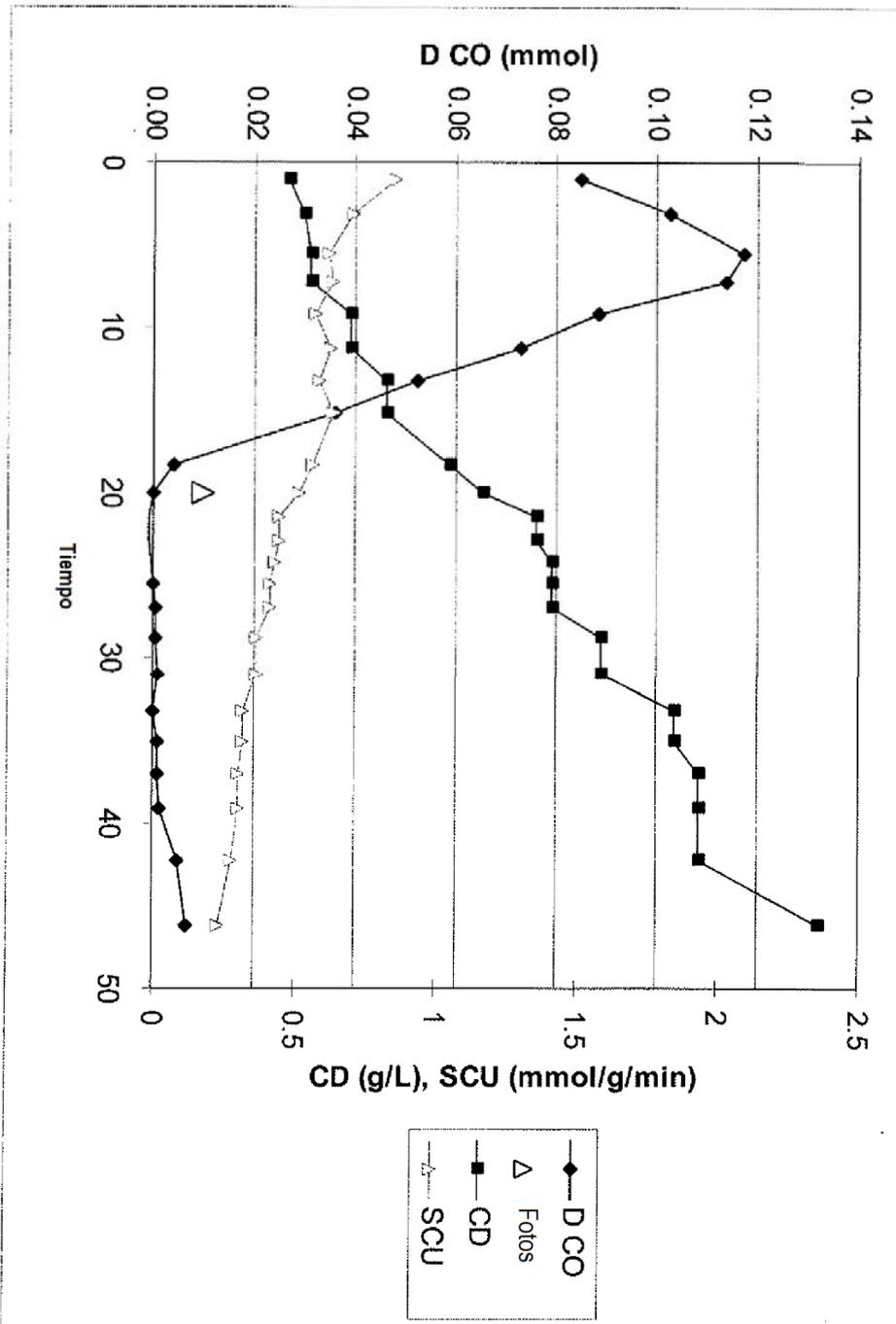


FIG.13

FIG. 14

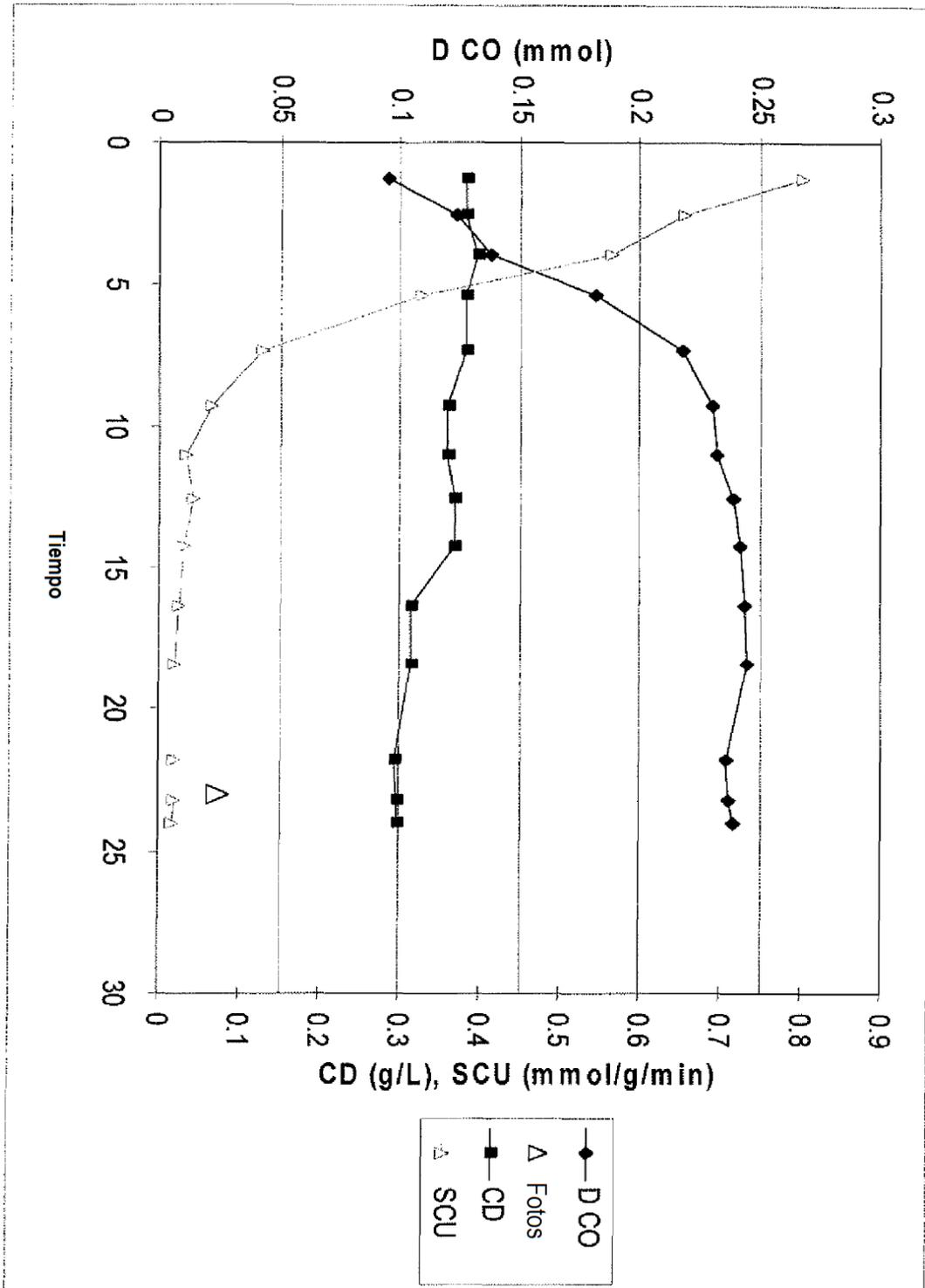
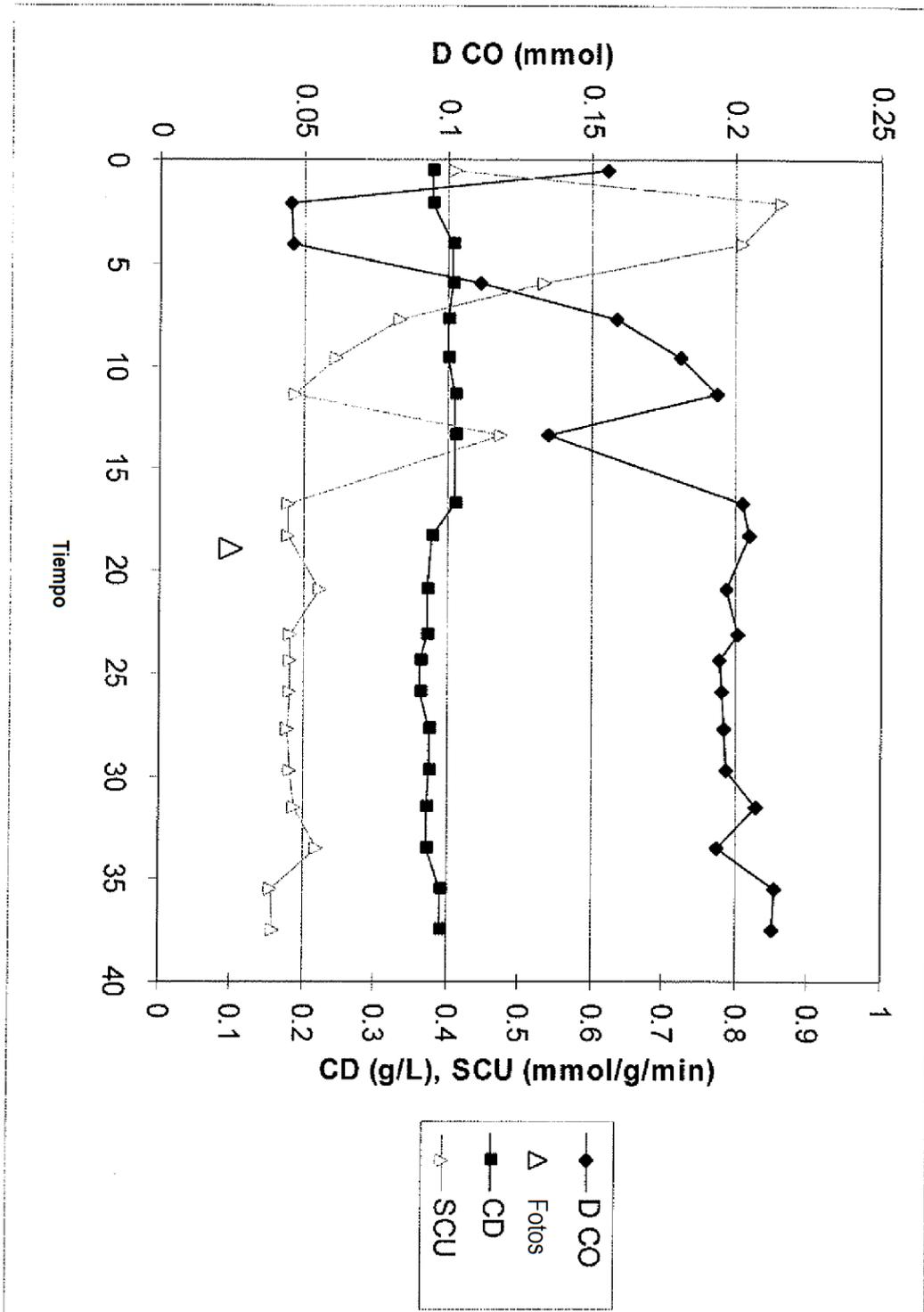


FIG. 15



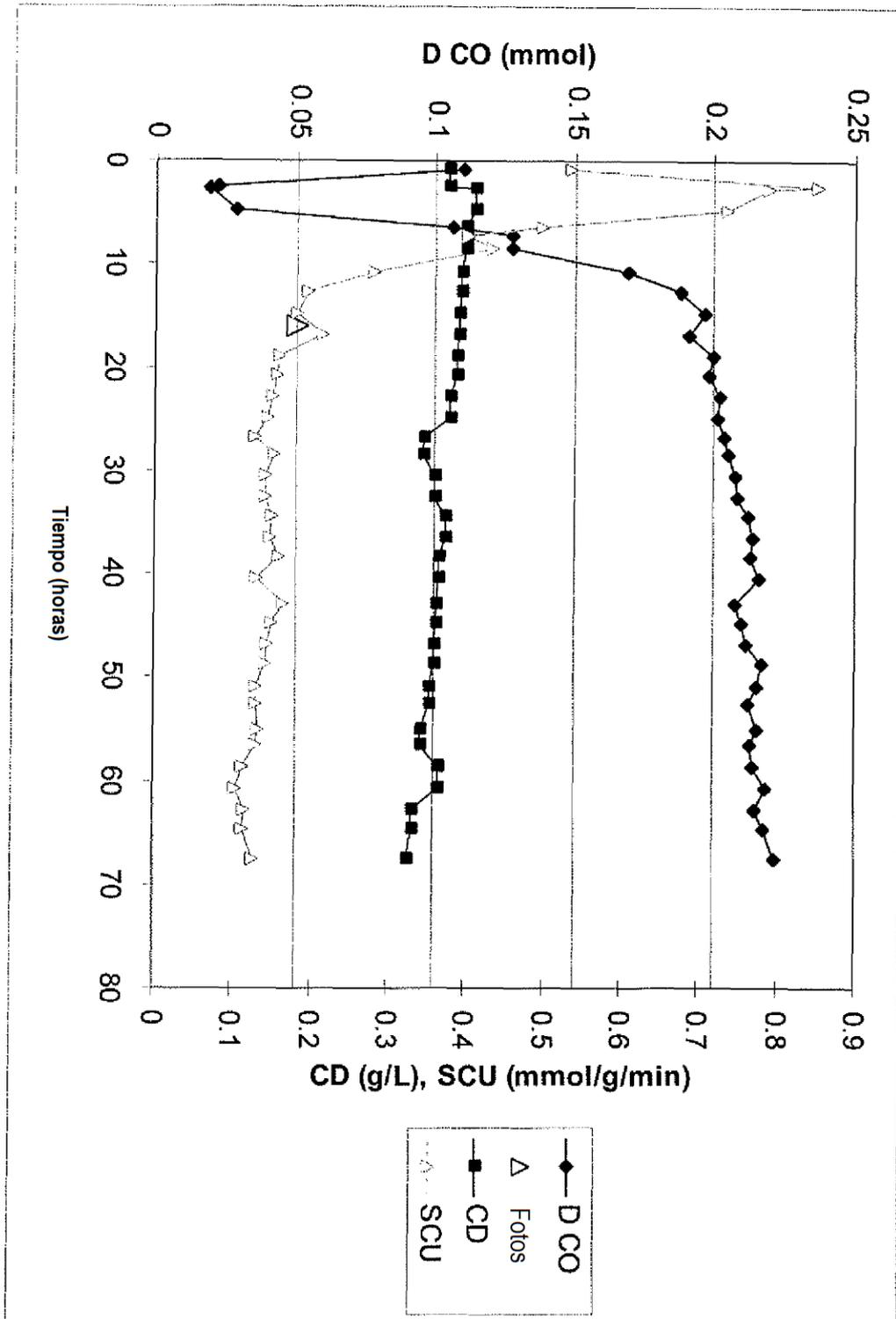


FIG.16

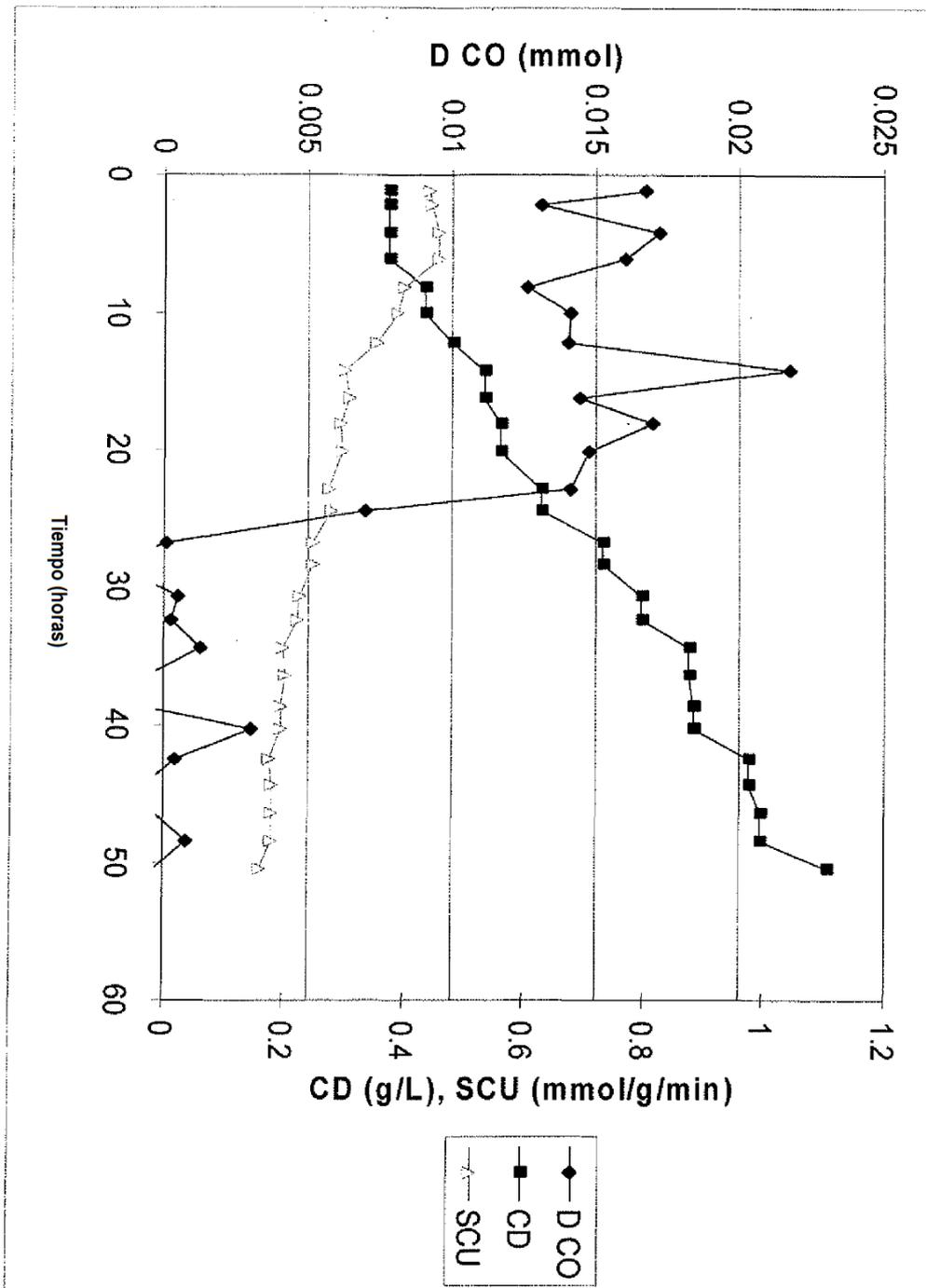


FIG. 17