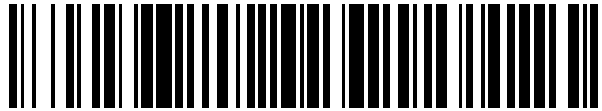


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 456**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12R 1/145	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2010 PCT/NZ2010/000029**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10098679**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010 E 10746498 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2401359**

54 Título: **Método de mantener la viabilidad de cultivos**

30 Prioridad:

26.02.2009 US 155870 P

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

14.11.2018

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)
24 Balfour Road Parnell
Auckland 1052, NZ**

72 Inventor/es:

**SIMPSON, SEAN DENNIS;
COLLET, CHRISTOPHE y
AL-SINAWI, BAKIR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 689 456 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

Método de mantener la viabilidad de cultivos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano durante períodos de sustrato limitado que comprende CO.

Antecedentes de la invención

10 El etanol se está convirtiendo rápidamente en un importante combustible líquido rico en hidrógeno para transporte en todo el mundo. El consumo mundial de etanol en 2005 fue de aproximadamente más de 55,4 millones de metros cúbicos (12,2 mil millones de galones británicos). También se ha predicho que el mercado global de la industria del combustible etanol continuará creciendo intensamente en el futuro, debido a un mayor interés por el etanol en Europa, Japón, Estados Unidos y varias naciones en desarrollo.

15 Por ejemplo, en Estados Unidos, el etanol se usa para producir E10, una mezcla al 10% de etanol en gasolina. En las mezclas E10, el componente etanol actúa como un agente oxigenante, mejorando la eficacia de la combustión y reduciendo la producción de contaminantes del aire. En Brasil, el etanol satisface aproximadamente el 30% de la demanda de combustible para transporte, tanto como un agente oxigenante mezclado en la gasolina como combustible puro por sí mismo. Además, en Europa, las preocupaciones medioambientales en torno a las consecuencias de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) han sido el estímulo para que la Unión Europea (UE) establezca para las naciones miembros un objetivo obligatorio para el consumo sostenible de combustibles para transporte, tal como el etanol derivado de biomasa.

20 La gran mayoría del etanol combustible se produce a través de procesos tradicionales de fermentación basados en levadura que utilizan carbohidratos derivados de cosechas, tal como sacarosa extraída de caña de azúcar o almidón extraído de cosechas de cereales, como principal fuente de carbono. Sin embargo, el costo de estas reservas alimentarias de carbohidratos está influenciado por su valor como alimento humano o animal, y el cultivo cosechas productoras de almidón o sacarosa para la producción de etanol no es económicamente sostenible en todas las zonas geográficas. Por lo tanto, es interesante desarrollar tecnologías para convertir recursos de carbono de menor costo y/o más abundantes en etanol combustible.

El CO es un subproducto importante, libre y rico en energía procedente de la combustión incompleta de materiales orgánicos, tales como carbón o petróleo y productos derivados del petróleo. Por ejemplo, se informa que la industria del acero en Australia produce y libera a la atmósfera anualmente más de 500.000 toneladas de CO.

30 Los procesos catalíticos se pueden usar para convertir gases que consisten principalmente en CO y/o CO e hidrógeno (H₂) en una variedad de combustibles y productos químicos. Los microorganismos se pueden usar también para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procesos biológicos, aunque generalmente son más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procesos catalíticos, que incluyen una mayor especificidad, mayores rendimientos, menores costos de energía y una mayor resistencia al envenenamiento.

35 La capacidad de los microorganismos para crecer en CO como única fuente de carbono se descubrió por primera vez en 1903. Más tarde se determinó que esto era una propiedad de organismos que utilizan la vía bioquímica de crecimiento autotrófico de la acetil-coenzima A (acetil CoA) (también conocida como la vía de Woods-Ljungdahl y la vía del monóxido de carbono-deshidrogenasa/acetil CoA-sintasa (CODH/ACS)). Se ha demostrado que una gran cantidad de organismos anaerobios, incluidos los organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos, metabolizan el CO hasta diversos productos finales, a saber, CO₂, H₂, metano, n-butanol, acetato y etanol. Al usar CO como la única fuente de carbono, todos estos organismos producen al menos dos de estos productos finales.

40 Se ha demostrado que bacterias anaerobias, tales como las del género *Clostridium*, producen etanol a partir de CO, CO₂ y H₂ a través de la vía bioquímica de la acetil-CoA. Por ejemplo, varias cepas de *Clostridium ljungdahlii* que producen etanol a partir de gases se describen en los documentos WO 00/68407, EP 117309, las patentes de EE.UU. N° 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, y los documentos WO 98/00558 y WO 02/08438. Una nueva cepa de *Clostridium carboxydivorans*, que convierte CO en etanol y puede catalizar la producción de acetato y butanol, se describe en la solicitud de patente US2007/0275447. La bacteria *Clostridium autoethanogenum* sp también se sabe que produce etanol a partir de gases (Abrini et al., *Archives of Microbiology* 161, pp. 345-351 (1994)).

45 Sin embargo, la producción de etanol por microorganismos por fermentación de gases siempre está asociada con la coproducción de acetato y/o ácido acético. Como parte del carbono disponible se convierte en acetato/ácido acético en lugar de etanol, puede ser menos que la deseable la eficacia de producción de etanol utilizando tales procesos de fermentación. Además, a menos que el subproducto de acetato/ácido acético se pueda usar para algún otro fin, puede plantear un problema de eliminación de desechos. El acetato/ácido acético es convertido en metano por microorganismos y, por lo tanto, tiene el potencial de contribuir a las emisiones de GEI.

Se sabe que varias enzimas asociadas con la capacidad de los microorganismos para usar monóxido de carbono como su única fuente de carbono y energía requieren cofactores metálicos para su actividad. Los ejemplos de enzimas clave que requieren la unión del cofactor metálico para la actividad incluyen monóxido de carbonodeshidrogenasa (CODH) y acetil-CoA-sintasa (ACS).

5 Los documentos WO2007/117157 y WO2008/115080 describen procesos que producen alcoholes, particularmente etanol, por fermentación anaerobia de gases que contienen monóxido de carbono. El acetato producido como subproducto del proceso de fermentación descrito en el documento WO2007/117157 se convierte en hidrógeno gaseoso y dióxido de carbono gaseoso, uno o ambos de los cuales se pueden usar en el proceso de fermentación anaerobia.

10 La fermentación de sustratos gaseosos que comprenden CO, para producir productos, tales como ácidos y alcoholes, típicamente favorece la producción de ácidos. La productividad de alcoholes se puede mejorar por métodos conocidos en la técnica, tales como los métodos descritos en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925 y WO2009/064200.

15 Con el fin de mantener la viabilidad de una o más bacterias carboxidotróficas, tales como bacterias acetogénicas, debe estar disponible para el cultivo microbiano una corriente de sustrato sustancialmente continua que comprenda cantidades suficientes de CO. En consecuencia, si una cantidad suficiente de CO (o CO₂/H₂) no está disponible para el cultivo microbiano, el cultivo se puede deteriorar y finalmente morir. Por ejemplo, durante tiempos de suministro insuficiente de CO, tales como períodos de almacenamiento, suministro limitado de sustrato o transferencia de cultivo/inóculo, un cultivo microbiano agotará rápidamente el CO disponible y se deteriorará la viabilidad.

20 El documento WO2009/114127 proporciona un método para mantener la viabilidad de los microorganismos durante períodos de suministro limitado de sustrato. Sin embargo, el método incluye añadir CO₂ al biorreactor en el que una cantidad significativa de etanol se convierte en acetato, dando como resultado una disminución del pH. Este efecto se debe contrarrestar para evitar la inhibición por exceso de ácido acético molecular.

Sumario de la invención

25 La presente invención proporciona un método para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano en un proceso de fermentación industrial en el que es limitado el suministro de un sustrato que comprende CO como fuente de carbono, comprendiendo el método:

30 a. proporcionar una corriente de sustrato gaseoso que comprende CO procedente de un proceso industrial a un biorreactor que comprende un cultivo microbiano de bacterias *Clostridium* carboxidotróficas en un medio nutriente líquido, siendo el proceso industrial un proceso de fabricación de acero o un proceso de gasificación de biomasa o de desechos sólidos municipales;

b. disminuir la temperatura del cultivo microbiano en por lo menos 5°C por debajo de la temperatura de operación óptima cuando es limitada la concentración de CO; y

35 c. aumentar la temperatura del cultivo microbiano hasta su temperatura de operación en respuesta a la concentración de CO cuando ya no es limitada

en donde (i) el suministro de sustrato que comprende CO es limitado cuando el proceso industrial es un proceso de fabricación de acero que se desacelera o detiene, o cuando el proceso industrial es un proceso de gasificación de biomasa o de desechos sólidos municipales en el cual el contenido de CO de la corriente disminuye o el gasificador está fuera de producción; y (ii) la bacteria *Clostridium* se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*.

40 En general, se considera que un sustrato es limitado cuando no hay suficiente CO disponible para mantener por el cultivo microbiano el crecimiento y/o la producción de metabolitos. Por ejemplo, en un cultivo continuo, se considera que el sustrato es limitado cuando no puede mantenerse el crecimiento en estado estacionario.

45 Típicamente, el sustrato que comprende CO es consumido por un cultivo microbiano a una tasa de al menos al menos 0,1 mmol/g de células microbianas/minuto; o al menos 0,2 mmol/g/minuto; o al menos 0,3 mmol/g/minuto; o al menos 0,4 mmol/g/minuto; o al menos 0,5 mmol/g/minuto. Como tal, en realizaciones particulares, el sustrato que comprende CO es limitado si está disponible para el cultivo microbiano menos que al menos 0,1 mmol/g de células microbianas/minuto; o al menos 0,2 mmol/g/minuto; o al menos 0,3 mmol/g/minuto; o al menos 0,4 mmol/g/minuto; o al menos 0,5 mmol/g/minuto. La limitación del sustrato se asocia típicamente a un cese o ralentización del crecimiento del microorganismo.

50 En ciertas realizaciones de la invención, la temperatura del cultivo microbiano se reduce en al menos 5°; o en al menos 10°; o en al menos 15°; o en al menos 20°; o en al menos 25°; o en al menos 30° por debajo de la temperatura de operación óptima del cultivo microbiano. Los expertos en la técnica valorarán, tras la consideración de la presente descripción, la temperatura óptima de operación de una bacteria carboxidotrófica. Sin embargo, a modo de ejemplo, *Clostridium autoethanogenum* tiene una temperatura de operación óptima de 37°C. Como tal, en

realizaciones particulares de la invención, la temperatura del cultivo microbiano se reduce hasta menos de 32°C, o menos de 30°C, o menos de 25°C, o menos de 20°C, o menos de 15°C, o menos de 10°C, o menos de 5°C.

5 En realizaciones particulares de la invención, la temperatura del cultivo microbiano se puede reducir enfriando directa o indirectamente el medio nutriente líquido. En realizaciones particulares, al menos una parte del medio nutriente líquido se puede hacer pasar a través de medios de intercambio de calor para enfriar el líquido. Adicionalmente, o alternativamente, el biorreactor que contiene el cultivo microbiano se puede enfriar por cualesquiera medios de enfriamiento conocidos, tal como una camisa de enfriamiento.

En realizaciones particulares, la viabilidad del cultivo microbiano se puede mantener sustancialmente a temperatura reducida durante al menos 3 h, o al menos 5 h, o al menos 7 h, o al menos 15 h, o al menos 30 h, o al menos 48 h.

10 En la presente memoria se describe un método para almacenar un cultivo microbiano de una bacteria carboxidotrófica, en el que es limitada, o no está disponible, una corriente de sustrato, comprendiendo el método la etapa de reducir la temperatura del cultivo microbiano por debajo de la temperatura de operación óptima. Después del almacenamiento, por ejemplo, cuando se restaura una corriente de sustrato que comprende suficiente CO, la temperatura del cultivo microbiano se puede aumentar hasta la temperatura de operación óptima. En tales
15 situaciones, la viabilidad del cultivo microbiano se mantiene sustancialmente durante el enfriamiento, el almacenamiento y el calentamiento.

También se describe en la presente memoria un método para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano durante el almacenamiento, incluyendo el método las etapas de:

20 enfriar el cultivo microbiano hasta una temperatura o intervalo de temperaturas por debajo de la temperatura de operación óptima, y
almacenar el cultivo microbiano durante un período de tiempo.

El método puede incluir calentar el cultivo hasta la temperatura de operación óptima después del almacenamiento.

El período extendido puede ser de al menos 3 h, o al menos 5 h, o al menos 7 h, o al menos 15 h, o al menos 30 h, o al menos 48 h.

25 El método de la invención se usa para mantener la viabilidad de un cultivo durante períodos de suministro limitado de CO. El enfriamiento del cultivo microbiano mantiene la viabilidad durante un período extendido.

30 Como se describe en la presente memoria, el almacenamiento del cultivo incluye situaciones en las que el cultivo se mantiene en un biorreactor en condiciones de sustrato limitadas. Adicional o alternativamente, el cultivo puede ser transferido desde un biorreactor a un recipiente de almacenamiento. El cultivo puede ser devuelto a un biorreactor en un momento posterior.

El cultivo microbiano se puede utilizar para inocular un biorreactor después del almacenamiento. En tales situaciones, el cultivo microbiano se puede calentar hasta la temperatura de operación óptima antes, durante o después de la inoculación.

35 Las realizaciones de la invención encuentran aplicación particular en la producción de ácidos y alcoholes, tal como etanol por fermentación de un sustrato gaseoso que comprende CO. El sustrato comprende un gas obtenido como subproducto de un proceso industrial. En una realización, el proceso industrial es la gasificación de biomasa. En una realización de la invención, el sustrato gaseoso es gas de síntesis. En una realización, el sustrato gaseoso comprende un gas obtenido de una acería.

40 El sustrato que contiene CO contendrá típicamente una proporción mayoritaria de CO, tal como al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, de 40% a 95% de CO en volumen, de 40% a 60% de CO en volumen, y de 45% a 55% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO, o aproximadamente 60%
45 de CO en volumen. Los sustratos que tienen concentraciones más bajas de CO, tal como 6%, también pueden ser apropiados, particularmente cuando también están presentes H₂ y CO₂.

En diversas realizaciones, la fermentación se lleva a cabo usando un cultivo de una o más cepas de bacterias *Clostridium*. En una realización, la bacteria es *Clostridium autoethanogenum*.

50 El método de la invención se puede usar para producir cualquiera de una variedad de alcoholes, que incluyen, sin limitación, etanol y/o butanol, por fermentación anaerobia de ácidos en presencia de sustratos, particularmente sustratos gaseosos que contienen monóxido de carbono. El método de la invención se puede aplicar también a fermentaciones aerobias, a fermentaciones anaerobias o aeróbicas de otros productos, que incluyen, aunque sin limitación, isopropanol, y a la fermentación de sustratos distintos de gases que contienen carbono.

[En la presente memoria se describe un sistema para la fermentación de un sustrato que comprende CO, que

incluye al menos un biorreactor; medios determinantes adaptados para determinar, si es limitado o no es limitado, el sustrato que comprende CO proporcionado a un cultivo microbiano; y medios de control de la temperatura configurados de manera que, en uso, la temperatura del biorreactor se pueda ajustar en respuesta a la determinación de si es limitado, o no limitado, el suministro del sustrato que comprende CO al cultivo microbiano.

- 5 En realizaciones particulares de este sistema, los medios de control se configuran para reducir la temperatura del biorreactor si los medios determinantes determinan que si es limitado el suministro del sustrato que comprende CO. En realizaciones particulares, el sistema incluye medios de procesamiento configurados de modo que la temperatura del biorreactor se pueda regular automáticamente en respuesta a cambios en si es limitado, o no limitado, el sustrato que comprende CO.
- 10 En otra realización del sistema, los medios de control de la temperatura se configuran de manera que la temperatura del biorreactor se pueda mantener a la temperatura de operación óptima o próxima a ella si el sustrato no es limitante.

Descripción detallada de la invención

- 15 De acuerdo con el método de la invención, se ha reconocido sorprendentemente que los cultivos microbianos carboxidotróficos se pueden almacenar con alimentación y/o agitación del sustrato adicional mínima o ninguna, a temperaturas por debajo de su valor óptimo.

20 Cuando un sustrato que comprende CO, por ejemplo, una corriente de sustrato gaseoso, no está continuamente disponible, el cultivo microbiano se puede enfriar hasta una temperatura por debajo de la temperatura de operación óptima y ser almacenado hasta que esté disponible más sustrato. En otras realizaciones en las que el sustrato es limitado (es decir, donde está CO disponible pero no suficiente para promover el crecimiento y/o la producción de metabolitos óptimos), el cultivo microbiano se puede enfriar para reducir el requerimiento de CO.

25 El método de la invención se puede usar para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano a lo largo de períodos de suministro de sustrato limitado. Por ejemplo, la fermentación continua en estado estacionario de un sustrato que comprende CO requiere típicamente que el sustrato se proporcione de una manera no limitada, tal que se mantenga una tasa de crecimiento y de producción de metabolitos sustancialmente constante. Sin embargo, el método de la invención se puede usar para mantener la viabilidad del cultivo durante períodos de suministro limitado de sustrato que de lo contrario daría como resultado el deterioro del cultivo.

30 Sin estar vinculados a ninguna teoría, para mantener la viabilidad de las bacterias carboxidotróficas, tal como *Clostridium autoethanogenum*, el CO necesita ser suministrado al cultivo a una tasa mayor o igual a la tasa de absorción de CO del cultivo microbiano. Por ejemplo, en condiciones óptimas requeridas para promover el crecimiento y/o la producción de metabolitos, la tasa de absorción de CO del cultivo microbiano es de al menos 0,1 mmol/g de células microbianas/minuto; o al menos 0,2 mmol/g/minuto; o al menos 0,3 mmol/g/minuto; o al menos 0,4 mmol/g/minuto; o al menos 0,5 mmol/g/minuto. Por consiguiente, cuando se pone en suspensión un cultivo microbiano en un medio nutriente líquido, el cultivo se empobrecerá rápidamente en CO disuelto en el medio a menos que el CO disuelto se pueda reponer a una velocidad igual o más rápida que la tasa de absorción de CO. Como el CO es escasamente soluble en medios nutrientes acuosos, se requiere típicamente una fuerza externa, tal como agitación y/o presión elevada, además de un suministro constante de un sustrato que comprenda CO para mantener en la solución la velocidad de transferencia de CO deseable. En los biorreactores, esto se logra típicamente burbujeando CO en el medio nutriente líquido y opcionalmente agitando adicionalmente el líquido para aumentar la velocidad de transferencia de CO al líquido.

45 De acuerdo con el método de la invención, el enfriamiento del cultivo microbiano mantiene sustancialmente la viabilidad del cultivo durante un período prolongado. En realizaciones particulares, el empobrecimiento de CO en un recipiente de almacenamiento se puede minimizar enfriando el recipiente. Adicional o alternativamente, el cultivo microbiano se puede dejar enfriar hasta una temperatura ambiente más baja. De acuerdo con esto, cuando dichos cultivos son devueltos opcionalmente hasta una temperatura óptima (o a un intervalo de temperaturas óptimo), se observa más rápidamente el crecimiento microbiano y/o la productividad deseada. Dicho método mejora, o al menos reduce, la necesidad de CO adicional, burbujeo y/o agitación.

Definiciones

50 A menos que se defina lo contrario, los siguientes términos utilizados a lo largo de esta memoria se definen de la siguiente manera:

El término "sustrato que comprende monóxido de carbono" y términos similares debe entenderse que incluye cualquier sustrato en el que el monóxido de carbono está disponible para, por ejemplo, una o más cepas de bacterias para crecimiento y/o fermentación.

55 "Sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" incluye cualquier gas que contenga monóxido de carbono. El sustrato gaseoso contendrá típicamente una proporción significativa de CO, preferiblemente al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 100% de CO en volumen.

En el contexto de los productos de fermentación, el término "ácido" como se usa en la presente memoria incluye tanto ácidos carboxílicos como el anión carboxilato asociado, tal como la mezcla de ácido acético libre y acetato presente en un caldo de fermentación como se describe en la presente memoria. La relación entre ácido molecular y carboxilato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema. El término "acetato" incluye tanto la sal acetato sola como una mezcla de ácido acético libre o molecular y sal acetato, tal como la mezcla de sal acetato y ácido acético libre presente en un caldo de fermentación como puede ser descrito en la presente memoria. La relación entre ácido acético molecular y acetato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema.

El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consta de uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías, que incluye un reactor de depósito agitado continuo (abreviadamente CSTR por sus iniciales en inglés), un reactor de células inmovilizadas (abreviadamente ICR por sus iniciales en inglés), un reactor de lecho percolador (abreviadamente TBR por sus iniciales en inglés), un reactor de columna de burbujas, un fermentador de elevación de gas, un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membranas con fibras huecas (abreviadamente HFMBR por sus iniciales en inglés), un mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido.

A menos que el contexto requiera lo contrario, las frases "fermentación", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, tal como se usan en la presente memoria, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del proceso. Como se describirá adicionalmente en la presente memoria, en algunas realizaciones, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, debe entenderse que la adición de metales o composiciones a una reacción de fermentación incluye la adición a uno o ambos de estos reactores.

A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos "almacenamiento" y "almacenar" se utilizan con referencia a los períodos en que un cultivo microbiano tiene un suministro de sustrato limitado o un sustrato no está disponible. Como tal, el término incluye periodos en los que un cultivo microbiano bajo condiciones de crecimiento en estado estacionario está temporalmente no disponible o limitado en el suministro de sustrato e incluye periodos en los que se transfiere un cultivo microbiano desde un biorreactor a un recipiente de almacenamiento, tal como un recipiente de transferencia de inóculo.

El término "conversión neta total" y similares, como se usa en la presente memoria, pretende describir la conversión de sustratos, tales como CO, en productos que incluyen ácido(s) y/o alcohol(es) por un cultivo microbiano en un momento particular. Se reconoce que porciones de un cultivo microbiano se pueden dedicar a diferentes funciones en un momento particular y se pueden producir varios productos. Además, uno o más de los productos presentes en el caldo de fermentación se pueden convertir en otros productos. En consecuencia, la conversión neta global incluye todos los productos producidos por el cultivo microbiano en cualquier momento particular.

Aunque la siguiente descripción se centra en realizaciones particulares de la invención, concretamente la producción de etanol y/o acetato usando CO como sustrato primario, se debe apreciar que la invención puede ser aplicable a la producción de alcoholes y/o ácidos alternativos y al uso de sustratos alternativos como será conocido por los expertos en la técnica a la que se refiere la invención. Por ejemplo, se pueden usar sustratos gaseosos que contengan dióxido de carbono e hidrógeno. Además, la invención puede ser aplicable a la fermentación para producir butirato, propionato, caproato, etanol, propanol y butanol. El método puede ser útil también para producir hidrógeno.

El método de la invención se adapta para usar corrientes de gas producidas por uno o más procesos industriales. Dichos procesos incluyen procesos de fabricación de acero, particularmente procesos que producen una corriente de gas que tiene un alto contenido de CO o un contenido de CO por encima de un nivel predeterminado (es decir, 5%). De acuerdo con dichas realizaciones, las bacterias acetogénicas se usan preferiblemente para producir ácidos y/o alcoholes, particularmente etanol o butanol, dentro de uno o más biorreactores. El método de la invención tiene una aplicabilidad particular para mejorar la captura total de carbono y/o la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos.

Fermentación

Se conocen procesos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos. Procesos ilustrativos incluyen los descritos, por ejemplo, en las solicitudes de patentes WO2007/117157, WO2008/115080, US 6.340.581, US 6.136.577, US 5.593.886, US 5.807.722 y US 5.821.111.

Se sabe que cierto número de bacterias anaerobias son capaces de llevar a cabo la fermentación de CO a alcoholes, que incluyen n-butanol y etanol, y ácido acético, y son adecuadas para usar en el proceso de la presente invención. Las bacterias que son adecuadas para su uso en la invención son las del género *Clostridium*, tales como las cepas *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo las descritas en los documentos WO 00/68407, EP 117309, Patentes de Estados Unidos N° 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, solicitudes WO 98/00558 y WO 02/08438, *Clostridium ragsdalei* (WO/2008/028055) y *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al., *Archives of Microbiology* 161: pp. 345-351. También se apreciará que la invención se puede aplicar a un cultivo mixto de dos o más bacterias.

Un microorganismo ilustrativo adecuado para uso en la presente invención es *Clostridium autoethanogenum*. En una

realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificadoras de la cepa depositada en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) bajo el número de identificación de depósito 19630. En otra realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificadoras del número de depósito DSMZ 10061.

El cultivo de las bacterias usadas en los métodos de la invención se puede realizar usando cualquier número de procesos conocidos en la técnica para cultivar y fermentar sustratos usando bacterias anaerobias. Se proporcionan técnicas ilustrativas en el apartado "Ejemplos" más adelante. A modo de ejemplo adicional, se pueden utilizar los procesos generalmente descritos en los siguientes artículos que usan sustratos gaseosos para la fermentación: (i) K. T. Klasson, et al., (1991). *Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. Conservation and Recycling*, 5; 145-165; (ii) K. T. Klasson, et al., (1991). *Bioreactor design for synthesis gas fermentations. Fuel*. 70. 605-614; (iii) K. T. Klasson, et al., (1992). *Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology*. 14; 602-608; (iv) J. L. Vega, et al., (1989). *Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. Biotech. Bioeng.* 34. 6. 785-793; (v) J. L. Vega, et al., (1989). *Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate 1. Batch Culture. Biotechnology and Bioengineering*. 34. 6. 774-784; (vi) J. L. Vega, et al., (1990). *Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. Resources, Conservation and Recycling*. 3. 149-160. La fermentación se puede llevar a cabo en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de depósito agitado continuo (CSTR), un reactor de células inmovilizadas, un reactor de elevación de gas, un reactor de columna de burbujas (BCR), un reactor de membranas, tal como un biorreactor de membranas con fibras huecas (HFMBR) o un reactor de lecho percolador (TBR). Además, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que se cultivan los microorganismos, y un segundo reactor de fermentación, al que se alimenta el caldo de fermentación del reactor de crecimiento y en el que se produce la mayoría del producto de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato).

De acuerdo con el método de la invención, la fuente de carbono para la reacción de fermentación es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como subproducto de un proceso industrial. En una realización, el proceso industrial es la fabricación de acero, tal como una acería. En esta realización, el sustrato que contiene CO puede ser capturado del proceso industrial antes de ser emitido a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO, puede ser deseable también tratarlo para eliminar cualesquiera impurezas no deseadas, tales como partículas de polvo antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede ser filtrado o lavado usando métodos conocidos.

Alternativamente, el sustrato que contiene CO se puede obtener de la gasificación de biomasa. El proceso de gasificación implica la combustión parcial de biomasa con un suministro restringido de aire u oxígeno. El gas resultante típicamente comprende principalmente CO y H₂, con volúmenes mínimos de CO₂, metano, etileno y etano. Por ejemplo, los subproductos de biomasa obtenidos durante la extracción y procesamiento de materiales alimentarios, tales como azúcar de la caña de azúcar o almidón de maíz o granos, o se pueden gasificar desechos de biomasa no alimentarios generados por la industria forestal para producir un gas que contenga CO adecuado para uso en la presente invención.

El sustrato que contiene CO contendrá típicamente una proporción mayoritaria de CO, tal como al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, de 40% a 95% de CO en volumen, de 60% a 90% de CO en volumen, y de 70% a 90% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende 25%, o 30%, o 35%, o 40%, o 45%, o 50% de CO en volumen. También pueden ser apropiados sustratos que tengan concentraciones más bajas de CO, tal como 6%, particularmente cuando están también presentes H₂ y CO₂.

Si bien no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H₂ no debe ser perjudicial para la formación del producto de acuerdo con los métodos de la invención. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una eficacia global mejorada de la producción de alcohol. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el sustrato puede comprender una relación H₂:CO de aproximadamente 2:1 o 1:1 o 1:2. En otras realizaciones, la corriente de sustrato comprende bajas concentraciones de H₂, por ejemplo, menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o está sustancialmente libre de hidrógeno. El sustrato puede contener también algo de CO₂, por ejemplo, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO₂ en volumen, o de 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen.

El monóxido de carbono se añade a la reacción de fermentación en estado gaseoso.

Se apreciará que para que tenga lugar el crecimiento de las bacterias y la fermentación de CO a alcohol, además del sustrato gaseoso que contiene CO, será necesario alimentar al biorreactor con un medio nutriente líquido adecuado. Un medio nutriente contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo utilizado. En la técnica se conocen medios anaerobios adecuados para la fermentación de etanol usando CO como la única fuente de carbono. Por ejemplo, se describen medios adecuados en las patentes de EE.UU. Nº 5.173.429 y 5.593.886 y en las solicitudes de patente WO 02/08438, WO2007/115157 y WO2008/115080 antes citadas. En la presente memoria se describe un nuevo medio que tiene mayor eficacia para mantener el crecimiento de los

microorganismos y/o la producción de alcohol en el proceso de fermentación. Estos medios se describirán con más detalle más adelante.

5 La fermentación se debe llevar a cabo deseablemente en condiciones apropiadas para que tenga lugar la fermentación deseada (por ejemplo, CO a etanol). Las condiciones de reacción que se deben considerar incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial redox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor de depósito agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato de gas para asegurar que el CO en la fase líquida no se vuelva limitante, y las concentraciones máximas del producto para evitar la inhibición del producto. Las condiciones adecuadas se describen en los documentos WO02/08438, WO07/117157 y WO08/115080.

10 Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular utilizado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se realice a una presión mayor que la presión ambiente. Operar a presiones elevadas permite un aumento significativo en la velocidad de transferencia de CO desde la fase gaseosa a la fase líquida, donde puede ser absorbida por el microorganismo como fuente de carbono para la producción de etanol. Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen de líquido en el biorreactor dividido por el caudal del gas de entrada) se pueda reducir cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de a presión atmosférica.

15 Además, dado que una determinada tasa de conversión de CO en etanol es en parte función del tiempo de retención del sustrato, y lograr un tiempo de retención deseado a su vez determina el volumen requerido de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en gran medida el volumen del biorreactor requerido, y en consecuencia el costo de capital del equipo de fermentación. De acuerdo con los ejemplos dados en la patente de EE.UU. N° 5.593.886, el volumen del reactor se puede reducir en proporción lineal a los aumentos de la presión de operación del reactor, es decir, los biorreactores que operan a 10 atmósferas de presión solo necesitan tener la décima parte del volumen de los que operan a 1 atmósfera de presión.

20 Los beneficios de llevar a cabo una fermentación de gas a etanol a presiones elevadas se han descrito también en otra parte. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones de 2,1 kg/cm² manométricos (30 psig) y 5,2 kg/cm² manométricos (75 psig), dando productividades de etanol de 150 g/L/día y 369 g/L/día, respectivamente. Sin embargo, se encontró que las fermentaciones ilustrativas realizadas usando medios y composiciones de gas de entrada similares a presión atmosférica producen entre 10 y 20 veces menos etanol por litro y por día.

25 También es deseable que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no se vuelva limitante. Esto es debido a que una consecuencia de las condiciones limitadas de CO puede ser que el producto de etanol sea consumido por el cultivo.

Recuperación de productos

35 Los productos de la reacción de fermentación se pueden recuperar usando métodos conocidos. Los métodos ilustrativos incluyen los descritos en las solicitudes de patentes WO07/117157, WO08/115080, US 6.340.581, US 6.136.577, US 5.593.886, US 5.807.722 y US 5.821.111. Sin embargo, brevemente y a modo de ejemplo, solo se puede recuperar etanol del caldo de fermentación por métodos tales como destilación fraccionada o evaporación, y fermentación extractora.

40 La destilación de etanol desde un caldo de fermentación produce una mezcla azeotrópica de etanol y agua (es decir, 95% de etanol y 5% de agua). El etanol anhidro se puede obtener posteriormente por el uso de tecnología de deshidratación de etanol por tamiz molecular, que también es bien conocida en la técnica.

45 Los procedimientos de fermentación extractora implican el uso de un disolvente miscible en agua que presenta un bajo riesgo de toxicidad para el organismo de fermentación, para recuperar el etanol del caldo de fermentación diluido. Por ejemplo, el alcohol oleílico es un disolvente que se puede usar en este tipo de proceso de extracción. El alcohol oleílico se introduce continuamente en un fermentador, después de lo cual este disolvente se eleva formando una capa en la parte superior del fermentador que se extrae continuamente y se alimenta a través de una centrifuga. Entonces, el agua y las células se separan fácilmente del alcohol oleílico y se devuelven al fermentador mientras el disolvente cargado con etanol se alimenta a una unidad de vaporización súbita. La mayor parte del etanol se vaporiza y se condensa mientras que el alcohol oleílico no es volátil y se recupera para su reutilización en la fermentación.

50 El acetato, que se produce como un subproducto en la reacción de fermentación, se puede recuperar también del caldo de fermentación usando métodos conocidos en la técnica.

55 Por ejemplo, se puede usar un sistema de adsorción que implique un filtro de carbón activado. En este caso, se prefiere que las células microbianas se separen primero del caldo de fermentación usando una unidad de separación adecuada. Se conocen en la técnica numerosos métodos basados en filtración para generar un caldo de fermentación libre de células para la recuperación del producto. El permeado que contiene etanol - y acetato - libre de células se hace pasar luego a través de una columna que contiene carbón activado para adsorber el acetato. El

acetato en forma ácida (ácido acético) en lugar de en forma de sal (acetato) es más fácilmente adsorbido por el carbón activado. Por lo tanto, se prefiere que el pH del caldo de fermentación se reduzca a menos de aproximadamente 3 antes de que se haga pasar a través de la columna de carbón activado, para convertir la mayor parte del acetato en la forma de ácido acético.

- 5 El ácido acético adsorbido por el carbón activado se puede recuperar por elución usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar etanol para eluir el acetato unido. En ciertas realizaciones, el etanol producido por el propio proceso de fermentación se puede usar para eluir el acetato. Debido a que el punto de ebullición del etanol es 78,8°C y el del ácido acético es 107°C, el etanol y el acetato se pueden separar fácilmente uno del otro usando un método basado en la volatilidad, tal como la destilación.
- 10 También se conocen en la técnica y se pueden usar en los procedimientos de la presente invención otros métodos para recuperar acetato a partir de un caldo de fermentación. Por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N° 6.368.819 y 6.753.170 describen un sistema disolvente y co-disolvente que se puede usar para la extracción de ácido acético de caldos de fermentación. Al igual que en el ejemplo del sistema basado en alcohol oleico descrito para la fermentación extractora de etanol, los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. N° 6.368.819 y
- 15 6.753.170 describen un disolvente/co-disolvente inmiscible en agua que se puede mezclar con el caldo de fermentación en presencia o ausencia de los microorganismos fermentados para extraer el producto ácido acético. El disolvente/co-disolvente que contiene el producto ácido acético se separa a continuación del caldo por destilación. A continuación, se puede usar una segunda etapa de destilación para purificar el ácido acético del sistema disolvente/co-disolvente.
- 20 Los productos de la reacción de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato) se pueden recuperar del caldo de fermentación retirando continuamente una porción del caldo del biorreactor de fermentación, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración) y recuperando una o más productos del caldo de manera simultánea o secuencial. En el caso del etanol, se puede recuperar convenientemente por destilación, y el acetato se puede recuperar por adsorción sobre carbón activado, usando los métodos descritos anteriormente. Las células
- 25 microbianas separadas se devuelven preferiblemente al biorreactor de fermentación. El permeado libre de células que queda después de que se hayan retirado el etanol y el acetato también se devuelve preferiblemente al biorreactor de fermentación. Se pueden añadir al permeado libre de células nutrientes adicionales (tales como vitaminas B) para reponer el medio nutriente antes de devolverlo al biorreactor. Además, si el pH del caldo se ajustó como se ha descrito antes para mejorar la adsorción de ácido acético por el carbón activado, el pH se debe reajustar a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de ser devuelto al biorreactor.
- 30

Mantenimiento de la viabilidad de cultivos

La invención proporciona un método para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano de ciertas cepas de bacterias *Clostridium*, en las que el sustrato que comprende CO es limitado o no disponible, comprendiendo el método reducir la temperatura del cultivo microbiano por debajo de la temperatura óptima para el crecimiento y/o la

35 producción de productos.

De acuerdo con el método de la invención, la viabilidad del cultivo se mantiene si, al ser calentado hasta una temperatura óptima (o intervalo), el cultivo puede reanudar el metabolismo para producir productos y/o crecimiento celular. El cultivo microbiano se puede usar para inocular un biorreactor y el mantenimiento de la viabilidad del cultivo asegura que el cultivo pueda reanudar el metabolismo después de la transferencia. Un cultivo microbiano

40 almacenado de esta manera puede continuar metabolizándose y/o creciendo, aunque a una velocidad más lenta. Sin embargo, al restaurar la temperatura del cultivo microbiano hacia el valor óptimo, se espera que el metabolismo y/o la tasa de crecimiento aumenten hasta los niveles previos al almacenamiento.

Un cultivo microbiano se vuelve limitado en CO cuando la velocidad de transferencia de CO a un medio nutriente acuoso es más lenta que la velocidad a la que el cultivo microbiano puede absorber (o consumir) el CO.

45 Típicamente, las bacterias carboxidotróficas, tales como *Clostridium autoethanogenum*, absorben CO de un medio nutriente líquido a una tasa mayor que 0,1 mmol/g de células microbianas/minuto; o al menos 0,2 mmol/g/minuto; o al menos 0,3 mmol/g/minuto; o al menos 0,4 mmol/g/minuto; o al menos 0,5 mmol/g/minuto. Por consiguiente, generalmente es necesario proporcionar al cultivo microbiano una corriente constante de un sustrato que comprende CO. Además, debido a la baja solubilidad del CO en sistemas acuosos, típicamente es necesario aumentar más las

50 tasas de transferencia de CO (transferencia de masa), por ejemplo, aumentando la presión parcial de CO en la corriente de sustrato y/o la agitación del medio nutriente líquido.

El método de la invención se puede usar para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano, en el que el cultivo microbiano está limitado en CO de modo que la velocidad de transferencia de CO a la solución es menor que la tasa de absorción del cultivo. Tales situaciones pueden surgir cuando un sustrato que comprende CO no se proporciona

55 continuamente al cultivo microbiano; la tasa de transferencia de masa es baja; o hay insuficiente CO en una corriente de sustrato para mantener la vitalidad del cultivo a la temperatura óptima. En tales situaciones, el cultivo microbiano consumirá rápidamente el CO disuelto en el medio nutriente líquido y se volverá un sustrato limitado ya que no se puede proporcionar más sustrato lo suficientemente rápido. A menos que el cultivo microbiano se enfríe de acuerdo con el método de la invención, la viabilidad del cultivo microbiano disminuirá con el tiempo, dando como

resultado la muerte completa del cultivo, o se deteriorará el cultivo a un nivel tal, que ya no está limitado por las condiciones.

Se reconoce que el metabolismo del cultivo microbiano puede disminuir cuando disminuye la temperatura, por lo que puede ser necesario ajustar las condiciones de operación, tales como los tiempos de retención celular.

5 Un cultivo microbiano almacenado se puede usar para la inoculación de un biorreactor. En tales situaciones, es deseable que el cultivo sea adecuadamente denso (es decir, un gran número de microbios por unidad de volumen) y que la viabilidad del cultivo se mantenga sustancialmente durante el almacenamiento (es decir, transporte a una ubicación remota). Típicamente, cuanto mayor es la densidad de las células microbianas en el cultivo, más rápido agotarán cualquier CO disponible en un medio nutriente líquido. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera 10 que cuando el CO no está disponible o está suficientemente agotado, disminuye la viabilidad del cultivo microbiano. Por ejemplo, al menos una parte del cultivo comienza a morir y/o el cultivo cambia a un metabolismo más lento, de modo que cuando un biorreactor se inocula con el cultivo microbiano, hay un retraso antes de que se alcancen altas tasas de crecimiento y/o productividad. Sin embargo, cuando el cultivo se enfría, el empobrecimiento de CO en el medio nutriente líquido se ralentiza de manera que la viabilidad del cultivo se conserva sustancialmente durante un 15 período prolongado.

De acuerdo con el método de la invención, el cultivo se enfría hasta una temperatura por debajo de la temperatura óptima de crecimiento y/o de la producción de metabolitos, de modo que la viabilidad del cultivo se mantenga durante un período prolongado. Típicamente, los microorganismos carboxidotróficos tienen una temperatura de 20 operación óptima de bacterias carboxidotróficas en el intervalo de 30-70°C. Ejemplos de temperatura de operación óptima se detallan en "*Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuels production*" por A.M. Henstra et al., en *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18, 200-206. Por ejemplo, *Clostridium autoethanogenum* y *Clostridium 25 ljungdahli* tienen una temperatura óptima de crecimiento y producción de metabolitos de aproximadamente 37°C. Como tal, de acuerdo con los métodos de la invención, es necesario enfriar el cultivo microbiano hasta al menos 5°; o al menos 10°; al menos 15°; o al menos 20°; o al menos 25°; o al menos 30° por debajo de la temperatura óptima para mantener la viabilidad del cultivo. Por ejemplo, *Clostridium autoethanogenum* se puede enfriar hasta menos de 30°C, o menos de 25°C, o menos de 20°C, o menos de 15°C, o menos de 10°C, o menos de 5°C.

De acuerdo con el método de la invención, en el enfriamiento la viabilidad del cultivo se mantiene durante períodos prolongados, incluso en ausencia de sustrato adicional que comprenda CO y/o agitación. En realizaciones 30 particulares, la viabilidad del cultivo se mantiene durante al menos 3 h, o al menos 5 h, o al menos 7 h, o al menos 15 h, o al menos 30 h, o al menos 48 h. Por ejemplo, *Clostridium autoethanogenum* permanece viable durante al menos 30 horas, cuando se almacena a temperatura reducida.

Los expertos en la técnica apreciarán que los medios requeridos para enfriar un cultivo microbiano dependerán de varios factores que incluyen el tamaño y la forma del recipiente que contiene el cultivo, la velocidad a la que se enfría el cultivo y si el cultivo es exotérmico o endotérmico. Por ejemplo, muchos procesos de fermentación a gran escala 35 deben ser enfriados externamente para eliminar el exceso de calor generado durante la reacción de fermentación. Los medios de enfriamiento conocidos ya proporcionados pueden ser adaptados para enfriar adicionalmente el cultivo microbiano para mantener la viabilidad. En realizaciones alternativas, cuando el cultivo microbiano requiere calentamiento externo para mantener la temperatura de operación óptima, el cultivo puede ser enfriado retirando la fuente de calor y permitiendo que el fermentador se enfríe hasta temperatura ambiente a lo largo del tiempo. 40 Adicional o alternativamente, tales cultivos pueden ser enfriados adicionalmente usando cualesquiera medios de refrigeración o enfriamiento conocidos.

En realizaciones particulares de la invención, el medio nutriente líquido se deja enfriar por debajo de la temperatura de operación óptima retirando el control de calor termostático. Bajo tales condiciones, la temperatura del medio nutriente líquido y el cultivo microbiano caerán hacia la temperatura ambiente a lo largo del tiempo. De acuerdo con 45 la invención, a medida que la temperatura del cultivo microbiano cae por debajo de la temperatura de operación óptima, aumenta la productividad de alcohol.

Los períodos en los que se puede mantener la viabilidad de un cultivo microbiano usando el método de la invención se encuentran comúnmente en procesos de fermentación industrial, puesto que la continuidad de una corriente de sustrato que comprende CO puede no estar garantizada. Cuando el sustrato que comprende CO procede de un 50 proceso industrial, tal como el gas residual de una acería, puede haber ocasiones en las que el proceso industrial (es decir, la fabricación de acero) se ralentice o se detenga durante períodos prolongados. Bajo tales condiciones, la producción de sustrato que comprende CO se ralentizará o detendrá por completo. Consecuentemente, cuando el suministro de CO es limitado o el CO no está disponible para un biorreactor que contiene un cultivo microbiano carboxidotrófico, la viabilidad del cultivo disminuirá con el tiempo. Sin embargo, de acuerdo con el método de la invención, si el cultivo se enfría, la viabilidad se puede mantener durante la operación limitada de CO. 55

De manera similar, cuando el gas de síntesis producido a partir de la gasificación de materias primas alimentarias, tal como biomasa o desechos sólidos municipales, se utiliza como la corriente de sustrato, puede haber ocasiones en que el contenido de CO de la corriente disminuya o el gasificador esté fuera de producción para mantenimiento (por ejemplo). De nuevo, bajo tales condiciones, la viabilidad de un cultivo microbiano que requiere CO para el

metabolismo se deteriorará a menos que el cultivo se pueda enfriar de acuerdo con el método de la invención.

5 En la presente memoria se describe un sistema para la fermentación de un sustrato que comprende CO, que incluye al menos un biorreactor; medios determinantes adaptados para determinar si es limitado, o no limitado, el sustrato que comprende CO proporcionado a un cultivo microbiano; y medios de control de temperatura configurados de manera que, en uso, la temperatura del biorreactor se puede ajustar en respuesta a la determinación de si es limitado, o no limitado, el suministro del sustrato que comprende CO al cultivo microbiano.

10 En realizaciones particulares del sistema anterior, donde los medios determinantes determinan que el suministro de sustrato ha llegado a ser limitado, la temperatura del cultivo microbiano se puede disminuir para mantener la viabilidad del cultivo. Adicional o alternativamente, cuando los medios determinantes determinen que el sustrato es no limitado, la temperatura se puede mantener sustancialmente a la temperatura de operación óptima. El sistema puede incluir medios de procesamiento, de manera que, en uso, los medios de control puedan regular automáticamente la temperatura del cultivo microbiano de acuerdo con los métodos de la invención.

15 La Figura 1 es una representación esquemática de un sistema 100. La corriente de sustrato de entrada 1 entra en el biorreactor 2 a través de un conducto adecuado. La corriente de sustrato de entrada 1 comprende CO y de acuerdo con los métodos de la invención, puede variar el caudal de suministro y/o la composición de la corriente de sustrato 1. El sistema 100 incluye medios determinantes 3 que, en uso, determinan si es limitado el sustrato suministrado a un cultivo microbiano en el biorreactor. El sistema 100 incluye medios de control de temperatura 4, que pueden regular la temperatura del biorreactor 1 de manera que se puede mantener un cultivo microbiano a una temperatura de operación óptima, o pueda ser disminuida y/o mantenida la temperatura a una temperatura inferior a la temperatura de operación óptima.

20 Los medios de control de la temperatura 4 se pueden configurar de manera que, en uso, si los medios determinantes determinan que el suministro del sustrato no es limitado, la temperatura de la fermentación se puede mantener en la temperatura de operación óptima o alrededor de ella. Adicional o alternativamente, si los medios determinantes 3 determinan que el suministro de sustrato es limitado, los medios de control 4 pueden disminuir la temperatura del biorreactor 1 de acuerdo con los métodos de la invención. Por lo tanto, la temperatura se puede controlar a una temperatura sustancialmente inferior a la temperatura de operación óptima hasta que el suministro de sustrato ya no sea limitante.

25 El sistema 100 puede incluir medios de procesamiento opcionales 5 configurados para regular automáticamente los medios de control 4, en respuesta a las determinaciones realizadas por los medios determinantes 3.

30 Ejemplos

Materiales y métodos

Preparación del medio LM33:

Componentes del medio	Concentración por 1,0 L de medio
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,2 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,26 g
NaH ₂ PO ₄	2,04 g
KCl	0,15 g
NH ₄ Cl	2,5 g
Solución compuesta de metales traza (LS06)	10 mL
Solución compuesta de vitamina B (LS03)	10 mL
Resazurina (2 g/L de solución madre)	1 mL
FeCl ₃ (5 g/L de solución madre)	2 mL
Cisteína·HCl	0,5 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Solución compuesta de vitamina B (LS03)	por L de solución madre
Biotina	20,0 mg
Ácido fólico	20,0 mg
Hidrocloruro de piridoxina	10,0 mg
Tiamina.HCl	50,0 mg
Riboflavina	50,0 mg
Ácido nicotínico	50,0 mg
D-(*)-pantotenato de calcio	50,0 mg
Vitamina B ₁₂	50,0 mg
Ácido p-aminobenzoico	50,0 mg
Ácido tióctico	50,0 mg
Agua destilada	Hasta 1 litro

Solución compuesta de metales traza (LS06)	por L de solución madre
Ácido nitrilotriacético	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,0 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ . 6H ₂ O	0,8 g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,02 g
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,30 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03 g
Na ₂ SeO ₃	0,02 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g
Na ₂ WO ₄ .6H ₂ O	0,02 g

5 El medio se preparó a pH 5,5 de la siguiente manera. Todos los ingredientes, con la excepción de cisteína.HCl, se mezclaron en 400 mL de agua destilada. Esta solución se hizo anaerobia calentándola hasta ebullición y dejándola enfriar hasta la temperatura ambiente bajo un flujo constante de N₂ gaseoso. Una vez fría, se añadió cisteína.HCl y el pH de la solución se ajustó a 5,5 antes de completar el volumen hasta 1000 mL; la anaerobicidad se mantuvo a lo largo de los experimentos.

10 **Bacterias:** Se obtuvo *Clostridium autoethanogenum* en *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares). El número de acceso dado a la bacteria es DSMZ 19630.

Cultivo continuo típico en biorreactor a presión atmosférica para inóculo

Se llenó un biorreactor de cinco litros con 4900 mL de medio LM33 sin solución compuesta de vitamina B (LS03) ni cisteína.HCl y se trató en autoclave durante 30 minutos a 121°C. Mientras se enfriaba, el medio se burbujeó con N₂

5 para garantizar la anaerobicidad. A continuación, se añadieron la cisteína.HCl y la solución compuesta de vitamina B (LS03). La anaerobicidad se mantuvo durante toda la fermentación. El gas se cambió a 95% de CO y 5% de CO₂ a presión atmosférica antes de la inoculación con 100 mL de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum*. El biorreactor se mantuvo a 37°C agitado a 200 rpm al comienzo del cultivo. Durante la fase de crecimiento, la agitación se aumentó hasta 400 rpm. El pH se ajustó a 5,5 y se mantuvo por la adición automática de NaOH 5M. Se añadió continuamente al biorreactor medio anaerobio de nueva aportación para mantener en el biorreactor un nivel definido de biomasa y acetato.

Ejemplo 1:

10 Frascos de suero estéril se purgaron tres veces con gas que contenía CO (20% de CO₂, 30% de N₂ y 3% de H₂ en CO) y luego se llevaron hasta un vacío de - 0,35 Kg/cm² (-5 psi). Se transfirieron directamente 50 mL de biomasa que contenía el cultivo activo, acetato y trazas de etanol a presión atmosférica desde un biorreactor continuo hasta un frasco de suero de 234 mL. El espacio de cabeza de 184 mL se llenó luego con el gas que contenía CO a 2,80 kg/cm² absolutos (40 psia) y se incubó sin agitar a la temperatura indicada.

15 Después de 3, 6, 24 y 31 horas de incubación, se transfirió una muestra de 2 mL de cada vial de suero a un nuevo vial de suero que contenía 50 mL de medio (LM33) preparado de acuerdo como anteriormente. Los viales se llenaron con el gas que contenía CO a 2,80 kg/cm² absolutos (40 psia) y se incubaron a 37°C durante varios días con agitación constante.

El crecimiento de los viales inoculados se evaluó visualmente a intervalos de tiempo y se asignaron -/+ /++ para describir ningún crecimiento, crecimiento ligero y crecimiento denso respectivamente (véase la Tabla 1).

20 Tabla 1. Crecimiento de cultivo de *Clostridium autoethanogenum* inoculado después de conservación a varias temperaturas durante 3, 6, 24 y 31 horas.

Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	3 h			6 h			24 h			31 h		
		Días después de la inoculación	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1
4°C		-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++
14°C		-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	-	+
24°C		-	+	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-
31°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

25 La temperatura óptima para la producción de productos y el crecimiento microbiano de *Clostridium autoethanogenum* es 37°C. A 37°C, los viales no agitados no eran viables o tenían una viabilidad sustancialmente reducida cuando se usaban para la inoculación después de 3, 6, 24 y 31 horas. Se considera que sin agitación el cultivo microbiano activo agota rápidamente el CO limitado disuelto en el medio nutriente líquido. El monóxido de carbono en exceso en el espacio de cabeza puede tener una transferencia limitada al medio nutriente líquido. Sin embargo, en ausencia de agitación se espera que habrá un gradiente de CO, en el que la superficie más superior del medio nutriente líquido puede tener una concentración de CO relativamente alta, pero ésta disminuirá hacia abajo a través del medio. En ausencia de agitación, las células microbianas sedimentarán en el fondo del vial, donde quedarán privadas sustancialmente de sustrato y disminuirá rápidamente su viabilidad. Posteriormente, el cultivo deteriorado o muerto no es adecuado para la inoculación.

30 Al reducir la temperatura del cultivo almacenado hasta 24°C, el cultivo microbiano se mantuvo sustancialmente viable para la inoculación de un biorreactor durante más de 3 h. A 14°C, el cultivo microbiano se mantuvo sustancialmente viable después del almacenamiento durante 3 h, 6 h y 24 h. Después de 31 h de almacenamiento, el cultivo microbiano se mantuvo viable, pero tardó más en crecer después de la inoculación. A 4°C, el cultivo microbiano se mantuvo viable después del almacenamiento durante todo el tiempo investigado.

35 A lo largo de esta memoria y cualquiera de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprender", "que comprende" y similares deben interpretarse en un sentido incluyente en oposición a un sentido excluyente, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero no limitado a".

REIVINDICACIONES

1. Un método para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano en un proceso de fermentación industrial, en el que es limitado el suministro de un sustrato que comprende CO como fuente de carbono, comprendiendo el método:

5 a. proporcionar una corriente de sustrato gaseoso que comprende CO procedente de un proceso industrial a un biorreactor que comprende un cultivo microbiano de bacterias *Clostridium* carboxidotróficas en un medio nutriente líquido, siendo el proceso industrial un proceso de fabricación de acero o un proceso de gasificación de biomasa o de desechos sólidos municipales;

b. disminuir la temperatura del cultivo microbiano en por lo menos 5°C por debajo de la temperatura de operación óptima cuando es limitada la concentración de CO; y

10 c. aumentar la temperatura del cultivo microbiano hasta su temperatura de operación en respuesta a la concentración de CO cuando ya no es limitada;

15 en donde: (i) el suministro de sustrato que comprende CO es limitado cuando el proceso industrial es un proceso de fabricación de acero que se ralentiza o detiene, o cuando el proceso industrial es un proceso de gasificación de biomasa o de desechos sólidos municipales en los que el contenido de CO de la corriente disminuye o el gasificador está fuera de producción; y (ii) la bacteria *Clostridium* se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (b) la temperatura se mantiene al menos 10°C por debajo de la temperatura de operación óptima.

20 3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la viabilidad del cultivo se mantiene durante un período de CO limitado de al menos 3 horas.

4. Un método según la reivindicación 1, en el que la bacteria *Clostridium* es *Clostridium autoethanogenum*.

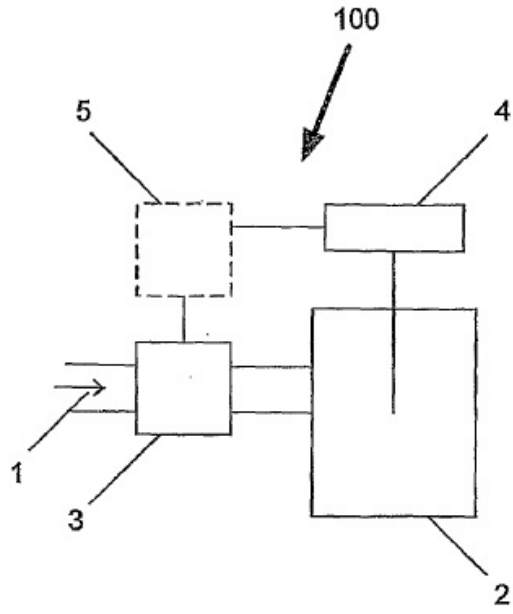


FIGURA 1