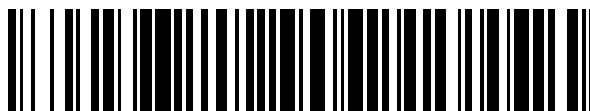


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 853**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/US2014/047200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15013132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14747484 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3024938**

54 Título: **Un proceso para fermentar sustratos gaseosos que contienen CO, utilizando un bajo nivel de selenio en el medio de fermentación**

30 Prioridad:

22.07.2013 US 201361857044 P
15.07.2014 US 201414331326

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

16.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KENDIRGI, FREDERIC;
SENARATNE, RYAN H. y
SCOTT, SYRONA R.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 689 853 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 fermentar sustratos gaseosos que contienen CO, utilizando un bajo nivel de selenio en el medio de fermentación

Se proporciona un proceso para fermentar un sustrato gaseoso que contiene CO, en el que los niveles de selenio en el medio de fermentación y en la biomasa que sale de la fermentación están a niveles bajos, y en el que el sustrato que contiene CO suministrado al fermentador tiene una proporción molar de H₂ a CO de 0,2 o más.

Antecedentes

Las fermentaciones tienen lugar en medios líquidos definidos. Estos medios típicamente incluirán diversas fuentes de macro y micronutrientes que son importantes para mejorar el rendimiento de la fermentación. Los medios utilizados en conexión con sustratos menos comunes, como sustratos gaseosos, requieren medios bien definidos para optimizar el rendimiento. Las fermentaciones anaeróbicas también requieren medios bien definidos.

Los microorganismos anaeróbicos 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 Estados Unidos No. 5,173,429 describe *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 49587, un microorganismo anaerobio que produce etanol y acetato a partir de gas de síntesis. La Patente de Estados Unidos No. 5,807,722 describe un método y aparato para convertir gases residuales en ácidos orgánicos y alcoholes usando *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 55380. La Patente de 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.

La patente de los Estados Unidos No. 7,285,402 describe medios conocidos para su uso en la fermentación anaerobia de sustratos gaseosos para producir etanol. Diversos componentes y concentraciones de componentes en el medio son efectivas para proporcionar altos niveles de productividad de etanol. La eliminación de ciertos componentes y la reducción de los niveles de concentración requeridos de otros componentes, al tiempo que se mantiene la productividad del etanol, puede proporcionar ahorros de costes significativos, especialmente a una fermentación a escala comercial.

La ruta de Wood-Ljungdahl es bien conocida en la técnica e incluye reacciones que se pueden separar en dos ramas: (1) rama de metilo y (2) rama de carbonilo. La rama de metilo convierte el gas de síntesis en metil-tetrahidrofolato (metil-THF) mientras que la rama de carbonilo convierte el metil-THF en acetil-CoA. El acetil-CoA se puede entonces convertir a etanol. Las enzimas catalizan reacciones en la ruta de Wood-Ljungdahl y esas enzimas requieren diversos elementos para una funcionalidad óptima. Por ejemplo, la formiato deshidrogenasa, una enzima importante en la ruta de Wood-Ljungdahl, requiere selenio para una actividad óptima. Saxena et al., *J Ind Microbiol Biotech* (2011), págs. 513-521, discuten el efecto de los oligoelementos en la producción de etanol del gas de síntesis por *Clostridium ragsdalei* y concluyen que un aumento en la concentración de SeO₄ podría aumentar la producción de etanol.

Sumario

El proceso de la invención para fermentar un sustrato gaseoso que contiene CO incluye fermentar el sustrato gaseoso que contiene CO en un medio de fermentación que tiene menos de 1 ppm de selenio y en el que el nivel de selenio en la biomasa que sale de la fermentación es de 0,01 a 1 ppm. Además, el sustrato que contiene CO proporcionado al fermentador tiene una proporción molar de H₂ a CO de 0,2 o más. El proceso es efectivo para proporcionar un STY específico (rendimiento de espacio tiempo) de al menos 1 gramo de etanol/(L·día·gramo de células). El medio de fermentación preferiblemente incluye al menos aproximadamente 112 mg de nitrógeno por gramo de células, al menos aproximadamente 10,5 mg de fósforo por gramo de células, o al menos aproximadamente 26 mg de potasio por gramo de células. El medio de fermentación tiene preferiblemente menos de aproximadamente 1,04 ppm de boro, menos de aproximadamente 0,16 ppm de manganeso, menos de aproximadamente 0,26 ppm de molibdeno o menos de aproximadamente 0,16 ppm de cobre.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra las conversiones de gases y la densidad celular de la inoculación de *Clostridium ljungdahlii* C-01 en un medio que no contiene Selenio.

La Figura 2 ilustra las conversiones de gases y la densidad celular de la inoculación de *Clostridium ljungdahlii* C-01 en un medio que contiene Selenio.

La Figura 3 muestra una comparación de curvas de crecimiento entre cultivos de *C. autoethanogenum* cultivados en tubos de cultivo con medio con y sin selenio.

Descripción detallada

5 Se proporciona un proceso que sorprendente e inesperadamente proporciona un alto nivel de productividad de etanol incluso después de eliminar o reducir las concentraciones de selenio que anteriormente se pensaba que eran esenciales o requeridas a ciertos niveles de concentración.

10 Las fermentaciones de gas de síntesis realizadas en biorreactores con medio y bacterias acetogénicas como se describe aquí son efectivas para proporcionar conversiones de CO en gas de síntesis a alcoholes y otros productos. En este aspecto, la productividad puede expresarse como STY (rendimiento de espacio tiempo expresado como g de alcohol total/(L·día). En este aspecto, el proceso es eficaz para proporcionar un STY (rendimiento de espacio tiempo) de al menos aproximadamente 10 g o más de alcohol total/(L·día). Los posibles valores de STY incluyen 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 de 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 de 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).

Definiciones

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

30 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 en el 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".

40 El término "sustrato gaseoso" se usa en un sentido no limitativo para incluir sustratos que contienen o se derivan de uno o más gases.

45 El término "sintegas" 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. Los 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 intermediarios 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 químicos.

50 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), reactor biopelícula de lecho móvil (MBBR), columna de burbujas, fermentador de elevación de gas, reactor de membrana como biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR), mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas líquido.

55 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.

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

65 El término "aumentar la eficiencia", " eficiencia aumentada " y similares, cuando se usa en relación con un proceso de fermentación incluye aumentar una o más de la tasa de crecimiento de microorganismos en la fermentación, el volumen o la masa del producto deseado (tal como alcoholes) producidos por volumen o masa de sustrato (tal como

monóxido de carbono) consumido, la rata de producción o nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido en comparación con otros subproductos de fermentación.

Tal como se usa aquí, "alcohol total" incluye etanol, butanol, propanol y metanol. En un aspecto, el alcohol total puede incluir al menos aproximadamente 75 por ciento en peso o más de etanol, en otro aspecto, aproximadamente 80 por ciento en peso o más de etanol, en otro aspecto, aproximadamente 85 por ciento en peso o más de etanol, en otro aspecto, aproximadamente 90 por ciento o más de etanol, y en otro aspecto, aproximadamente 95 por ciento en peso o más de etanol. En otro aspecto, el alcohol total puede incluir aproximadamente 25 por ciento en peso o menos de butanol.

El término "captación de CO específica" significa una cantidad de CO en mmoles consumida por la unidad de masa de células de microorganismos (g) por unidad de tiempo en minutos, es decir, mmoles/gramo/minuto.

Sustrato que contiene CO

Un sustrato que contiene CO puede incluir cualquier gas que incluya CO. En este aspecto, un gas que contiene CO puede incluir gas de síntesis, gases industriales y mezclas de los mismos.

El gas de síntesis puede proporcionarse desde cualquier fuente conocida, en un aspecto, el gas de síntesis puede obtenerse 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 CO al 10% molar, en un aspecto, al menos aproximadamente 20% molar, en un aspecto, aproximadamente 10 a aproximadamente 100% molar, en otro aspecto, aproximadamente 20 a aproximadamente 100% molar de CO, en otro aspecto, aproximadamente 30 a aproximadamente 90% molar de CO, en otro aspecto, aproximadamente 40 a aproximadamente 80% molar de CO, y en otro aspecto, aproximadamente 50 a aproximadamente 70% molar de CO. En la presente invención, el CO que contiene el sustrato proporcionado al fermentador tiene una proporción molar de H₂ a CO de 0,2 o más.

Algunos ejemplos de métodos y aparatos de gasificación adecuados se proporcionan en los números de serie de Estados Unidos 61/516,667, 61/516,704 y 61/516,646, todos los cuales fueron archivados el 6 de abril de 2011, véanse los correspondientes documentos US 2012/0256129, US 2012/0256130 y US 2012/0256131.

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.

Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO, el sustrato que contiene CO puede proporcionarse directamente a un proceso de fermentación o puede modificarse adicionalmente para incluir una proporción molar de H₂ a CO apropiada. El sustrato que contiene CO proporcionado al fermentador tiene una proporción molar de 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. El sustrato que contiene CO proporcionado al fermentador puede incluir aproximadamente 40 por ciento molar o más CO más H₂ y aproximadamente 30 por ciento molar o menos de CO, o aproximadamente 50 por ciento molar o más CO más H₂ y aproximadamente 35 por ciento molar o menos de CO, o aproximadamente 80 por ciento molar o más CO más H₂ y aproximadamente 20 por ciento molar o menos de CO.

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

En un aspecto, un separador de gas está configurado para separar sustancialmente al menos una parte de la corriente de gas, en la que la parte incluye uno o más componentes. Por ejemplo, el separador de gas puede separar CO₂ de una corriente de gas que comprende los siguientes componentes: CO, CO₂, H₂, en el que el CO₂ 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% molar o menos de CO₂, en otro aspecto, aproximadamente 1% molar o menos de CO₂, y en otro aspecto, aproximadamente 0,1% molar 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. En el proceso de la invención, el sustrato que contiene CO proporcionado al fermentador tiene una proporción molar de H₂ a CO₂ de 0,2 o más. 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 fábrica de una acería, se puede combinar con una corriente que comprende altas concentraciones de H₂, tal como el gas residual 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 indeseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o frotarse usando métodos conocidos.

15 Diseño y operación de biorreactores

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 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.

En un aspecto, los microorganismos utilizados incluyen bacterias acetogénicas. Los 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 números 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 los documentos WO 2007/117157 y WO 2009/151342 y *Clostridium ragsdalei* (P11, ATCC BAA-622) y *Alkalibaculum bacchi* (CP11, ATCC BAA-1772) incluidos los descritos respectivamente en la patente estadounidense No. 7,704,723 y "Biocombustibles y bioproductos a partir de gas de síntesis generado por biomasa", Hasan Atiyeh, presentada en Oklahoma EPSCoR Conferencia estatal anual, 29 de abril de 2010 y *Clostridium carboxidivorans* (ATCC PTA-7827) descrita 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*, *Butyrivacterium 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* ER12 (ATCC 55380), *Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988), *Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55889), *Clostridium magnum*, *Clostridium pasteurianum* (DSM 525 de DSMZ Alemania), *Clostridium ragsdali* P11 (ATCC BAA-622), *Clostridium scatologenes*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium ultunense*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Eubacterium limosum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Morrella thermoacetica*, *Morrella thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Ruminococcus productus*, *Thermoanaerobacter kivui*, y mezclas de los mismos.

Todas las cepas de este grupo tienen un tamaño del genoma de alrededor de 4,2 MBp (Kopke et al., 2010) y una composición de GC de alrededor del 32% molar (Abrini et al., 1994; Kopke et al., 2010; Tanner et al. 1993, documento WO 2008/028055, patente de Estados Unidos 2011/0229947) y operones de genes clave esenciales conservados que codifican enzimas de la ruta de Wood-Ljungdahl (monóxido de carbono deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintetasa, metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metileno-tetrahidrofolato reductasa, y monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), hidrogenasa, formiato deshidrogenasa, complejo Rnf (mfCDGEAB), piruvato:ferredoxin oxidoreductasa, aldehído:ferredoxin oxidoreductasa (Kopke et al., 2010, 2011). Se ha encontrado que la organización y el número de genes de la ruta de Wood-Ljungdahl, responsables de la absorción de gas, son los mismos en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos (Kopke et al., 2011).

Todas las cepas tienen una morfología y tamaño similar (las células de crecimiento logarítmicas están entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilas (temperatura óptima de crecimiento entre 30-37 °C) y estrictamente anaerobias (Abrini et al., 1994; Tanner et al., 1993) (documento WO 2008/028055). Además, todos comparten los mismos rasgos filogenéticos principales, como el mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), fuerte

- crecimiento autótrofo en gases que contienen CO con tasas de crecimiento similares, y un perfil metabólico con etanol y ácido acético como principal producto final de fermentación, con pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formados bajo ciertas condiciones (Abrini et al., 1994; Kopke et al., 2011; Tanner et al., 1993; documento WO 2008/028055). La producción de indol se ha observado con todas las especies. Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización del sustrato de diversos azúcares (por ejemplo, ramnosa, arabinosa), ácidos (por ejemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por ejemplo, arginina, histidina) u otros sustratos (por ejemplo, betaína, butanol). Se descubrió que algunas de las especies son auxótrofas a ciertas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina) mientras que otras no.
- Por lo tanto, los rasgos descritos no son específicos de un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino más bien rasgos generales para Clostridios carboxidotróficos que sintetizan etanol. Por lo tanto, se puede anticipar que la invención funcionará a través de estas cepas, aunque puede haber diferencias en el rendimiento.
- La fermentación se debe llevar a cabo bajo condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación deseada (por ejemplo, CO a etanol). Las condiciones de reacción que se deben considerar incluyen presión, temperatura, tasa de flujo de gas, tasa de flujo de líquido, pH del medio, potencial reacción de reducción:oxidación del medio, tasa de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato de gas para asegurar que el CO en la fase líquida no se vuelve limitante, y las concentraciones máximas del producto para evitar la inhibición del producto.
- Los métodos se pueden usar para mantener la viabilidad de un cultivo microbiano, en el que el cultivo microbiano está limitado en CO, de modo que la tasa 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 continuamente al cultivo microbiano; la tasa de transferencia de masa es baja; o hay CO insuficiente en una corriente de sustrato para mantener la vitalidad del cultivo a la temperatura óptima. En dichas realizaciones, el cultivo microbiano agotará rápidamente el CO disuelto en el medio de nutriente líquido y se volverá un sustrato limitado ya que no se puede proporcionar un sustrato adicional lo suficientemente rápido.
- Inicio: tras la inoculación, se establece una tasa de suministro de gas de alimentación inicial efectiva para el suministro de la población inicial de microorganismos. El gas efluente se analiza para determinar el contenido del mismo. 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 proporción 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.
- En otro aspecto, un proceso de fermentación incluye proporcionar gas de síntesis a un medio de fermentación en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de CO calculada inicial en el medio de fermentación de aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,70 mM, en otro aspecto, aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,50 mM, en otro aspecto, de aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,35 mM, en otro aspecto, de aproximadamente 0,20 mM a aproximadamente 0,30 mM, y en otro aspecto, de aproximadamente 0,23 mM a aproximadamente 0,27 mM. El proceso es efectivo para aumentar la densidad celular en comparación con una densidad de células iniciales.
- Postinicio: 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 30 gramos/litro, 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 30 gramos/litro, en otro aspecto, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 gramos/litro, y en otro aspecto, aproximadamente 4 a aproximadamente 5 gramos/litro.
- Composición del medio
- En un aspecto, el medio incluye al menos una o más de una fuente de nitrógeno, al menos una o más fuentes de fósforo y al menos una o más de una fuente de potasio. El medio puede incluir cualquiera de los tres, cualquier combinación de los tres, y en un aspecto importante, incluye los tres. Una fuente de nitrógeno puede incluir una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en cloruro de amonio, hidróxido de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y mezclas de los mismos. Una fuente de fósforo puede incluir una fuente de fósforo seleccionada del grupo que consiste en ácido fosfórico, fosfato de amonio, fosfato de potasio y mezclas de los mismos. Una fuente de potasio puede incluir una fuente de potasio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de potasio, fosfato de potasio, nitrato de potasio, sulfato de potasio y mezclas de los mismos.
- En un aspecto, el medio incluye uno o más de hierro, tungsteno, níquel, cobalto, magnesio, azufre y tiamina. El medio puede incluir cualquiera de estos componentes, cualquier combinación, y en un aspecto importante, incluye

5 todos estos componentes. Un hierro puede incluir una fuente de hierro seleccionada del grupo que consiste en cloruro ferroso, sulfato ferroso y mezclas de los mismos. Una fuente de tungsteno puede incluir una fuente de tungsteno seleccionada del grupo que consiste en tungstato de sodio, tungstato de calcio, tungstato de potasio y mezclas de los mismos. Una fuente de níquel puede incluir una fuente de níquel seleccionada del grupo que
 10 consiste en cloruro de níquel, sulfato de níquel, nitrato de níquel y mezclas de los mismos. Una fuente de cobalto puede incluir una fuente de cobalto seleccionada del grupo que consiste en cloruro de cobalto, fluoruro de cobalto, bromuro de cobalto, yoduro de cobalto y mezclas de los mismos. Una fuente de magnesio puede incluir una fuente de magnesio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de magnesio y mezclas de los mismos. Una fuente de azufre puede incluir cisteína, sulfuro de sodio y mezclas de los mismos.

Las concentraciones de diversos componentes son las siguientes:

Componente	Intervalo de concentración (expresado como mg o µg de nutriente por gramo de células)	Intervalo preferido (expresado como mg o µg de nutriente por gramo de células)
nitrógeno (N)	112-160 mg	140-150 mg
fósforo (P)	10,5-15 mg	12-13 mg
potasio (K)	26-36 mg	28-33 mg
hierro (Fe)	2,7-5 mg	3,0-4,0 mg
tungsteno (W)	10-30 µg	15-25 µg
Níquel (Ni)	34-40 µg	35-37 µg
cobalto (Co)	9-30 µg	15-20 µg
magnesio (Mg)	4,5-10 mg	5-7 mg
azúfre (S)	11-20 mg	12-16 mg
tiamina	6,5-20 µg	7-12 µg

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

20 En este aspecto, el medio puede tener niveles de concentración reducidos de uno o más nutrientes que incluyen B, Mn, Mo y Cu. Las concentraciones de nutrientes en el medio pueden ser las siguientes:

25 B: menos de aproximadamente 1,04 ppm de B, en otro aspecto, menos de aproximadamente 1,0 ppm de B, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,75 ppm de B, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,5 ppm de B, y en otro aspecto, menos que aproximadamente 0,025 ppm de B;

Mn: menos de aproximadamente 0,16 ppm de Mn, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,15 ppm de Mn, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,10 ppm de Mn, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,05 ppm de Mn, y en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,0025 ppm de Mn;

30 Mo: menos de aproximadamente 0,26 ppm de Mo, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,25 ppm de Mo, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,20 ppm de Mo, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,10 ppm de Mo, y en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,001 ppm de Mo; o

35 Cu: menos de aproximadamente 0,16 ppm de Cu, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,15 ppm de Cu, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,10 ppm de B, en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,05 ppm de B, y en otro aspecto, menos de aproximadamente 0,01 ppm B.

En otro aspecto, las proporciones de peso pueden ser las siguientes:

40 NH_4^+ a B: aproximadamente 625:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 650:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 675:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 700:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 750:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 800:1 o más; o

ES 2 689 853 T3

- NH₄⁺ a Mn: aproximadamente 4.050:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.100:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.200:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.300:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.400:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 4.500:1 o más; o
- 5 NH₄⁺ a Mo: aproximadamente 2.500:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 2.600:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 2.700:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 2.800:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 2.900:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 3.000:1 o más; o
- 10 NH₄⁺ a Cu: aproximadamente 4.050:1 o más; en otro aspecto, aproximadamente 4.100:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.200:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.300:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 4.400:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 4.500:1 o más; o
- 15 P a B: aproximadamente 30:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 35:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 40:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 45:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 50:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 100:1 o más; o
- 20 P a Mn: aproximadamente 190:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 200:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 225:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 250:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 275:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 300:1 o más; o
- 25 P a Mo: aproximadamente 120:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 130:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 140:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 150:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 175:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 200:1 o más; o
- 30 P a Cu: aproximadamente 190:1 o más; en otro aspecto, aproximadamente 200:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 225:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 250:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 275:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 300:1 o más; o
- 35 K a B: aproximadamente 35:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 40:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 45:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 50:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 75:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 100:1 o más; o
- 40 K a Mn: aproximadamente 245:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 250:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 260:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 270:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 280:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 300:1 o más; o
- 45 K a Mo: aproximadamente 150:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 250:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 260:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 270:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 280:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 300:1 o más; o
- 50 K a Cu: aproximadamente 245:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 250:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 260:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 270:1 o más, en otro aspecto, aproximadamente 280:1 o más, y en otro aspecto, aproximadamente 300:1 o más.
- 55 En otro aspecto, el proceso y los medios son efectivos para proporcionar una conversión de CO de al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 99%, en otro aspecto, aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, en otro aspecto, aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, en otro aspecto, aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, y en otro aspecto, aproximadamente 40% a aproximadamente 90%.
- 60 En otro aspecto, el proceso es eficaz para proporcionar un nivel de Se en la biomasa que sale de la fermentación de 0,01 a 1 ppm de selenio, en otro aspecto, aproximadamente 0,75 ppm o menos, y en otro aspecto, aproximadamente 0,5 ppm o menos, todo en base al peso seco. En otro aspecto, el nivel de Se en la biomasa que sale de la fermentación puede ser de 0,01 a aproximadamente 0,9 ppm, en otro aspecto, de 0,01 a aproximadamente 0,75 ppm, en otro aspecto, de 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, en otro aspecto, de 0,01 a aproximadamente 0,25 ppm, en otro aspecto, aproximadamente 0,025 a 1 ppm, en otro aspecto, aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,9 ppm, en otro aspecto, aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,75 ppm, en otro aspecto, aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,5 ppm, en otro aspecto, aproximadamente 0,5 a 1 ppm, en otro aspecto, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,9 ppm, y en otro aspecto, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,75 ppm. En un aspecto, Se puede incluir otras formas de selenio que incluyen -2, +2, +4 y +6 estados de oxidación, y puede incluir, por ejemplo, selenito y selenato. Los intervalos indicados se refieren a equivalentes de Se.

Ejemplos

- 65 Ejemplo 1: Evaluación del crecimiento del cultivo en medio con selenito de sodio

Preparación del medio: el medio se preparó de la siguiente manera:

1x Medio	Cantidad	6x Medio A2		6x TE	
FeCl ₂ .4H ₂ O (g)	0,24	Na ₂ SeO ₃ (g)	0,08	H ₃ PO ₄ (85%) (mL)	68,2
H ₃ PO ₄ (85%) (mL)	0,86	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O (g)	1,92	CoCl ₂ .6H ₂ O (g)	0,88
KCl (g)	3,00	H ₃ PO ₄ (85%) (mL)	0,00	NiCl ₂ .6H ₂ O (g)	0,00
MgCl ₂ .6H ₂ O (g)	0,48	Agua (mL)	a 500	ZnSO ₄ .7H ₂ O (g)	1,07
Agua (L)	9,50			Agua (mL)	a 500
6x Med A2 (mL)	15,0				
6x TE (mL)	4,6				
Vitaminas* (mL)	8,3				
Agua(L)	a 10L				
* Solución de vitaminas: biotina, 0,04 g/L; tiamina HCl, 0,1 g/L y calcio d-Pantotenato, 0,0505 g/L					

5 Inoculación y mantenimiento del reactor: Se preparó un reactor de la serie BioFlo 310 (New Brunswick) para la fermentación anaeróbica que incluye líneas de gas, tanto internas como externas, purga de cultivo, líneas de alimentación y un sistema de reciclaje de células que incluye extracción de permeado. Antes de la inoculación, el reactor se llenó con 2 l de medio y se purgó con gas de síntesis durante al menos 2 horas, la temperatura se elevó a 38 °C y se llevó el pH entre 4,4 y 4,7 y se mantuvo usando 0,5 M de NH₄OH. El hidrosulfuro sódico (0,2% v/v) se mezcló con el medio del reactor hasta una concentración final de 9x10⁻⁴% v/v. Durante la duración del experimento, la agitación se mantuvo a 800 rpm.

10 El reactor se inoculó con células que crecían exponencialmente desde un reactor principal para alcanzar una concentración celular inicial de 0,3 g/l (peso de células secas). Comenzando con una rata de flujo de gas de 15 ml/min de gas de síntesis (CO al 30%, H₂ al 15%, CO₂ al 10%), se realizaron aumentos del 10% del flujo de gas por hora para mantener el crecimiento celular y mantener las conversiones de H₂ y CO >25 % y >80%, respectivamente, según se determina por cromatografía de gases (GC, SRI 8610C). Durante todo el experimento, la rata del flujo de gas se mantuvo entre 250-300 ml/min. Se ajustó el flujo del medio para lograr un tiempo de retención de líquido de 18-24 horas y se controló la densidad celular usando un sistema de reciclado de células a base de fibra hueca. El hidrosulfuro de sodio (0,2% v/v) se mezcló continuamente de manera directa con el medio del reactor a una rata constante de 0,2 ml/min. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad celular de 2,5 a 3 g/l de peso de células secas (determinado por OD₅₈₀), el sistema de reciclaje celular se apagó y el reactor se ejecutó como un sistema de una sola pasada. Para analizar la formación del producto, se tomaron muestras líquidas cada 4 horas y se analizaron con un Liquid GC, Shimadzu GC-2014. Los reactores se mantuvieron en estado estacionario durante al menos 5 días.

25 La siguiente tabla resume el rendimiento de la fermentación en estado estacionario en un medio que contiene selenio (Se(+)) y la Figura 1 ilustra el crecimiento celular y las conversiones de gas a lo largo del tiempo.

Medio	Se (+)	
	Media	SD
Densidad celular (g/L)	2,96	0,21
Tiempo de retención celular (horas)	22,78	2,93
EtOH (g/L)	12,49	0,63
HAc (g/L)	3,19	0,6
BuOH (g/L)	0,22	0,02
H ₂ Conversiones (%)	52,68	0,25
CO Conversiones (%)	91,36	0,73
EtOH Productividad (g/L/día)	13,4	2,04
Productividad específica EtOH (g/L/día/g de células secas)	4,55	0,75

Medio	Se (+)	
	Media	SD
HAc Productividad (g/L/día)	3,72	0,5
Productividad específica Hac (g/L/día/g de células)	1,32	0,18
Proporción EtOH/Acetato	4,05	0,74
Proporción EtOH/BuOH	57,88	5,79
Productividad Total (g/L/día)	16,78	2,15

Ejemplo 2: Evaluación del crecimiento del cultivo en medio sin selenito de sodio

5 Preparación del medio: El medio de Selenio (-) se preparó como en el Ejemplo 1, excepto que el selenito de sodio se omitió de la receta.

Inoculación y mantenimiento del reactor: se utilizó una configuración como se describe en el Ejemplo 1.

10 La siguiente tabla resume el rendimiento de la fermentación en un medio sin selenio (Se(-)) y la Figura 2 ilustra el crecimiento celular y las conversiones de gas a lo largo del tiempo.

Medio	Se (-)	
	Media	SD
Densidad celular (g/L)	2,96	0,2
Tiempo de retención celular (horas)	25,65	1,91
EtOH (g/L)	13,67	0,97
HAc (g/L)	2,38	0,4
BuOH (g/L)	0,21	0,02
H ₂ Conversiones (%)	42,02	5,59
CO Conversiones (%)	85,03	2,27
EtOH Productividad (g/L/día)	12,88	1,53
Productividad específica EtOH (g/L/día/g de células secas)	4,36	0,48
HAc Productividad (g/L/día)	2,24	0,38
Productividad específica Hac (g/L/día/g de células)	0,76	0,15
Proporción EtOH/Acetato	5,93	1,23
Proporción EtOH/BuOH	67,35	8,24
Productividad Total (g/L/día)	15,06	1,61

Ejemplo 3: cuantificación de Se en la masa celular.

15 En el momento del apagado del reactor, se retiraron 200 ml de cultivo y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C en una centrifuga Allegra 25R (Beckman Coulter). El sedimento se lavó y se resuspendió con 50 ml de solución de NaCl al 0,8% enfriada con hielo y una vez más se centrifugó. El sedimento resultante se almacenó a -80 °C hasta el procesamiento. Paralelamente, se analizaron muestras del medio para detectar la presencia de Se mediante el método de análisis por plasma inductiva entre acoplado (ICP) estándar descrito en 'Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater' 19th edition, A.D. Eaton, L.S. Clesceri and A.E. Greenberg, 1995, pp 3-34 Capítulo 3120 B.

20

Análisis de células: el contenido de selenio de las células se determinó usando análisis de análisis por plasma inductiva entre acoplado (ICP). Las muestras se digirieron inicialmente con ácido nítrico (5% v/v) y H₂O₂ (10% v/v) a 120 °C durante 2 horas para disolver las células ("Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 19th edition, A.D. Eaton, L.S. Clesceri and A.E. Greenberg, 1995, pp 3-5, Capítulo 3030 E) y el digerido resultante se sometió a ICP.

5

Resultados: Evaluación del contenido de selenio en los medios. La siguiente tabla resume el contenido de metal en Se(+) y medio libre de Se utilizado en el experimento. Se tiene en cuenta que el contenido de Se en el medio libre de Se se encuentra en el límite de detección mediante el análisis ICP estándar, es decir, 0,03 ppm (*).

10

Elementos	Medio Se (+)		Medio Se (-)	
	Concentraciones (ppm)	SD (ppm)	Concentraciones (ppm)	SD (ppm)
Cl	114,2	3,83	112,3	3,21
Co	0,1981	0,004	0,1995	0,001
Fe	6,784	0,12	6,770	0,07
K	270,3	2,45	261,6	3,58
Mg	5,209	0,07	5,147	0,03
Na	0,8271	0,006	0,7483	0,007
Ni	0,2408	0,003	0,2407	0,003
P	69,43	1,46	66,83	0,62
S	2,054	0,02	2,050	0,007
Se*	0,1421	0,004	0,0322	0,000
W	3,362	0,03	3,246	0,07
Zn	0,4542	0,01	0,4502	0,005

Resultados: evaluación del contenido de selenio en las células. El análisis de Se en las células muestra que las células cultivadas en ausencia de selenito de sodio tienen un contenido de Se de 484 ppb (~0,5 ppm) en comparación con 34 ppm en las células cultivadas en presencia de sal de selenio. Esto constituye una reducción del 98,5% en el contenido de Se de las células.

15

Ejemplo 4: Evaluación de la rata de crecimiento celular de *C. autoethanogenum* en medio libre de Se usando tubos de cultivo.

20

El siguiente medio (MES al 1 %) se utilizó para el crecimiento en tubos de cultivo.

Componente	Cantidad por litro	
	(-) Se	(+) Se
MES (C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	10g	10g
Solución de sal mineral ⁽¹⁾	12,5 mL	12,5 mL
Solución de resazurin ⁽²⁾	1 mL	1 mL
H ₃ PO ₄ al 85%	37,5 mL	37,5 mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,10g	0,10g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,03g	0,03g
H ₃ BO ₃	0,30g	0,30g
COCl ₂ · 6H ₂ O	0,30g	0,30g
CuCl ₂ · H ₂ O	0,02g	0,02g

Componente	Cantidad por litro	
	(-) Se	(+) Se
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,071g	0,071g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,03g	0,03g
FeCl ₂ · H ₂ O	2,00g	2,00g
Na ₂ SeO ₃	-----	0,01g
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0,15g	0,15g
Total (en H ₂ O)	1.000 mL	1.000 mL

1. Solución madre de sal mineral (NaCl 80, g/L; NH₄Cl, 100 g/L; KCl, 10 g/L; KH₂PO₄, 10 g/L; MgSO₄·7H₂O, 20 g/L; CaCl₂·H₂O, 4 g/L).
2. Solución de resazurin (1 g/L sal de resazurin de sodio).

5 Los tubos de cultivo llenos con 4 ml de medio apropiado se inocularon con una reserva congelada de *C. autoethanogenum* (DSM #10061) y se presurizaron con gas de síntesis a 4 psig. Para preparar cultivos de semillas, los tubos se sometieron a gas diariamente con gas de síntesis hasta que el cultivo alcanzó una OD₅₈₀ de 1,2. Cuatro ml de MES +Se al 1% y/o MES -Se al 1% se inocularon con células vivas y se presurizaron con gas de síntesis. El inóculo se centrifugó primero a 3.000 rpm para sedimentar las células en condiciones anaeróbicas. El sedimento se resuspendió posteriormente en medio fresco Se(+) o Se(-) y se usó para inocular nuevos tubos de cultivo a un objetivo de OD₅₈₀= 0,3. Los cultivos se dejaron crecer en una incubadora de agitación a 37 °C a 70 rpm. Los tubos de cultivo inoculados con *C. autoethanogenum* a una OD₅₈₀ inicial= 0,3 en medio de MES Se(+) o Se(-) al 1% se controlaron a lo largo del tiempo. La densidad óptica de cada tubo se midió inmediatamente después de la inoculación y una vez al día después de eso. Como se ve en la Figura 3, las células en ambos medios crecieron a un OD₅₈₀>1. Durante la fase exponencial, ambos medios tuvieron la misma tasa de crecimiento.

15 Ejemplo 5: Evaluación del rendimiento de la fermentación y la productividad de *C. autoethanogenum* con medio libre de Se en un biorreactor.

20 El cultivo de *C. autoethanogenum* se usó para inocular un reactor de siembra que contenía medio de laboratorio (reactor de 1 l, biorreactor de tanque agitado SR0700ODLS, DASGIP). La inoculación y el mantenimiento del reactor fueron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Una vez que este cultivo alcanzó el estado estacionario, se usó para inocular un segundo reactor que contenía medio de laboratorio sin selenio. Luego se permitió que el cultivo secundario alcanzara el estado estacionario y se mantuvo en ese estado durante no menos de 72 horas. El reactor original también se controló durante este tiempo como una comparación.

25 La siguiente tabla resume la composición del medio para experimentos con *C. autoethanogenum*.

1x Medio (10L)	Cantidad	MPFN en 1L	Cantidad
FeCl ₂ .4H ₂ O (g)	0,30	Na ₂ SeO ₃ (g)	0,02
H ₃ PO ₄ (85%) (mL)	0,75	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O (g)	0,40
KCl (g)	1,50	H ₃ PO ₄ (85%) (mL)	100
MgCl ₂ .6H ₂ O (g)	1,25	ZnSO ₄ . 7H ₂ O (g)	0,20
Agua (L)	9,50	NiCl ₂ .6H ₂ O (g)	0,19
MPFN (mL)	75,00	CoCl ₂ .6H ₂ O (g)	0,80
Vitaminas* (mL)	5,00	Agua (mL)	a 1.000
Agua (L)	a 10L		

* Solución de vitaminas: Biotina, 0,04 g/L; Tiamina HCl, 0,1 g/L y calcio d-Pantotenato, 0,0505 g/L

Nota: Se preparó un MPFN separado sin Na₂SeO₃ para la parte del experimento en la que el cultivo se propagó en un medio que no contenía selenio.

ES 2 689 853 T3

La siguiente tabla resume el rendimiento de fermentación en estado estacionario de *C. autoethanogenum* en medios Se(+) y Se(-). Los parámetros en ambos casos cayeron dentro del intervalo esperado de desempeño y no mostraron diferencias significativas entre los dos.

	Medio Se (+)		Medio Se (-)	
	Media	SD	Media	SD
Densidad celular(g/L)	2,65	0,05	2,72	0,11
Tiempo de retención celular (horas)	22,97	0,41	21,98	1,62
EtOH (g/L)	15,84	0,97	13,95	0,59
HAc (g/L)	2,60	0,20	2,22	0,35
BuOH (g/L)	0,10	0,01	0,13	0,02
H ₂ Conversiones (%)	46,93	1,50	41,53	1,98
CO Conversiones (%)	88,13	0,90	87,37	1,26

5

Tendencias similares se pueden observar en la productividad de cada cultivo como se muestra a continuación.

	Medio Se (+)		Medio Se (-)	
	Media	SD	Media	SD
EtOH Productividad (g/L/día)	16,56	1,11	15,31	1,19
Productividad EtOH específica (g/L/día/g de células)	6,24	0,39	5,63	0,58
HAc Productividad (g/L/día)	2,72	0,22	2,44	0,43
Productividad Hac específica (g/L/día/g de células)	1,03	0,08	0,90	0,17
Proporción EtOH/Acetato	6,13	0,68	6,49	1,37
Proporción EtOH/BuOH	154,04	14,92	108,50	11,58
Productividad Total (g/L/día)	19,28	1,08	17,74	1,30

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para fermentar un sustrato gaseoso que contiene CO, el proceso que comprende fermentar el sustrato gaseoso que contiene CO en un medio de fermentación, siendo el proceso efectivo para proporcionar un STY específico (rendimiento de espacio tiempo) de al menos 1 gramo de etanol/(L·día·gramo de células), en el que el medio de fermentación tiene menos de 1 ppm de selenio, y en el que el nivel de selenio en la biomasa que sale de la fermentación es de 0,01 a 1 ppm, y además en el que el sustrato que contiene CO proporcionado al fermentador tiene una proporción molar H₂ a CO de 0,2 o más.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el medio de fermentación tiene menos de 1,04 ppm de boro, menos de 0,16 ppm de manganeso, menos de 0,26 ppm de molibdeno o menos de 0,16 ppm de cobre.
3. El proceso de la reivindicación 1, en el que el medio de fermentación incluye al menos uno o más de al menos 112 mg de nitrógeno por gramo de células, al menos 10,5 mg de fósforo por gramo de células, o al menos 26 mg de potasio por gramo de células.
4. El proceso de la reivindicación 3, en el que el medio de fermentación incluye al menos uno o más de 112 a 125 mg de nitrógeno por gramo de células, 10,5 a 15 mg de fósforo por gramo de células, o 26 a 36 mg de potasio por gramo de células.
5. El proceso de la reivindicación 3 en el que el nitrógeno se proporciona a partir de una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en cloruro de amonio, hidróxido de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y mezclas de los mismos, el fósforo se proporciona a partir de una fuente de fósforo seleccionada del grupo que consiste en ácido fosfórico, fosfato de amonio, fosfato de potasio y mezclas de los mismos, y el potasio se proporciona a partir de una fuente de potasio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de potasio, fosfato de potasio, nitrato de potasio, sulfato de potasio y mezclas de los mismos.
6. El proceso de la reivindicación 1, en el que el medio de fermentación incluye uno o más de al menos 2,7 mg de hierro por gramo de células, al menos 10 µg de tungsteno por gramo de células, al menos 34 µg de níquel por gramo de células, al menos 9 µg de cobalto por gramo de células, al menos 4,5 mg de magnesio por gramo de células, al menos 11 mg de azufre por gramo de células, y al menos 6,5 µg de tiamina por gramo de células.
7. El proceso de la reivindicación 6, en el que el medio de fermentación incluye uno o más de 2,7 a 5 mg de hierro por gramo de células, 10 a 30 µg de tungsteno por gramo de células, 34 a 40 µg de níquel por gramo de células, 9 a 30 µg de cobalto por gramo de células, 4,5 a 10 mg de magnesio por gramo de células, 11 a 20 mg de azufre por gramo de células, y 6,5 a 20 µg de tiamina por gramo de células.
8. El proceso de la reivindicación 6, en el que el hierro se proporciona a partir de una fuente de hierro seleccionada del grupo que consiste en cloruro ferroso, sulfato ferroso y mezclas de los mismos, el tungsteno se proporciona a partir de una fuente de tungsteno seleccionada del grupo que consiste del tungstato sódico, tungstato de calcio, tungstato de potasio y mezclas de los mismos, el níquel se proporciona a partir de una fuente de níquel seleccionada del grupo que consiste en cloruro de níquel, sulfato de níquel, nitrato de níquel y mezclas de los mismos, el cobalto se proporciona a partir de una fuente de cobalto seleccionada del grupo que consiste en cloruro de cobalto, fluoruro de cobalto, bromuro de cobalto, yoduro de cobalto y mezclas de los mismos, el magnesio se proporciona a partir de una fuente de magnesio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de magnesio y el azufre se proporciona a partir de una fuente de azufre seleccionada del grupo que consiste en cisteína, sulfuro de sodio y mezclas de los mismos.
9. El proceso de la reivindicación 1 en el que el pH del medio de fermentación se mantiene en un intervalo de 4,2 a 4,8 o en el que el gas de síntesis tiene una proporción CO/CO₂ de al menos 0,75 o en el que la fermentación incluye poner en contacto el gas de síntesis con una o más bacterias acetogénicas.
10. El proceso de la reivindicación 1 en el que el proceso es eficaz para proporcionar una densidad celular de al menos 1,0 g/L o en el que el proceso es eficaz para proporcionar una conversión de CO de 5 a 99% o en el que el medio de fermentación tiene menos de 0,01 g/L de extracto de levadura o en el que el medio de fermentación tiene menos de 0,01 g/l de carbohidratos.

Figura 1

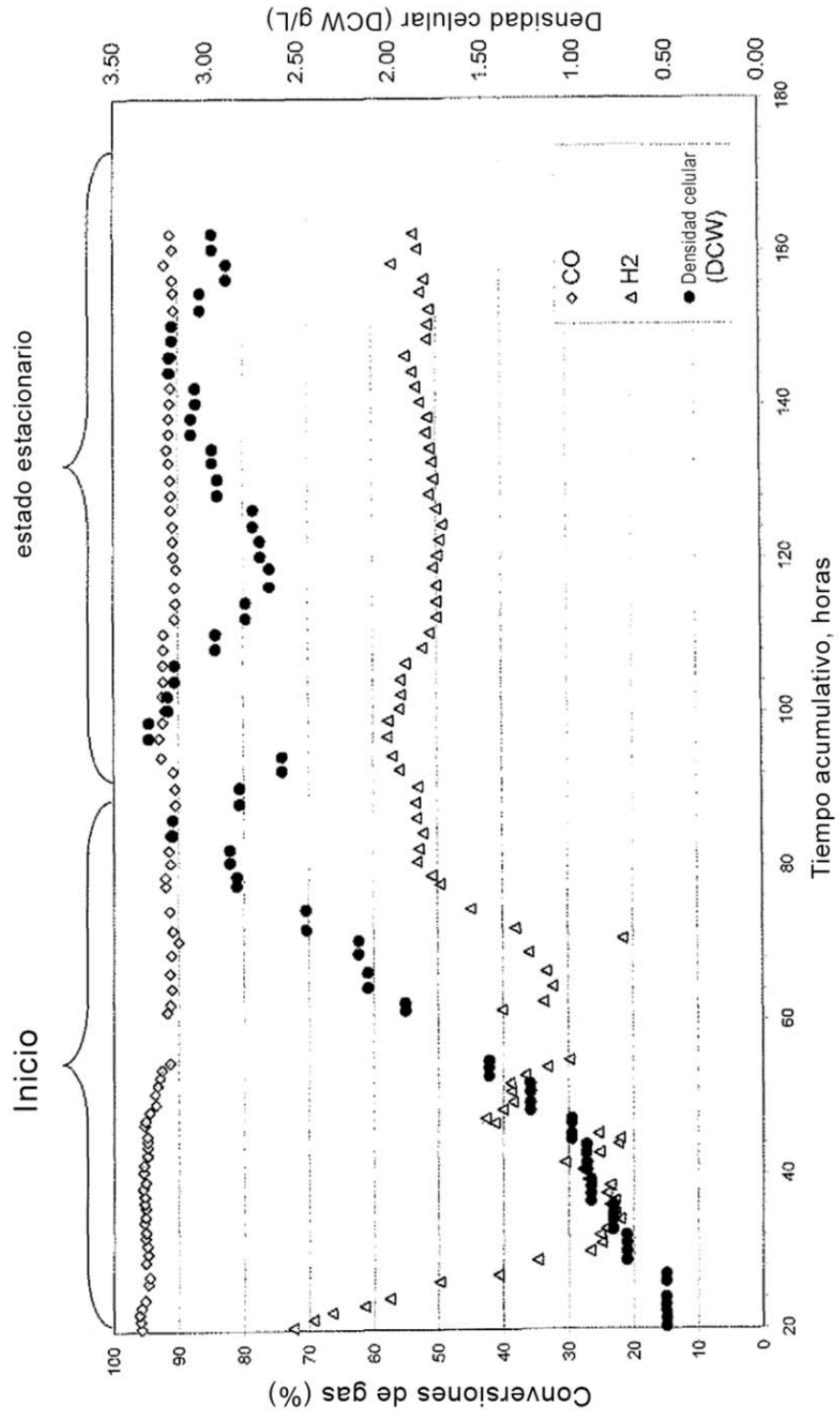


Figura 2

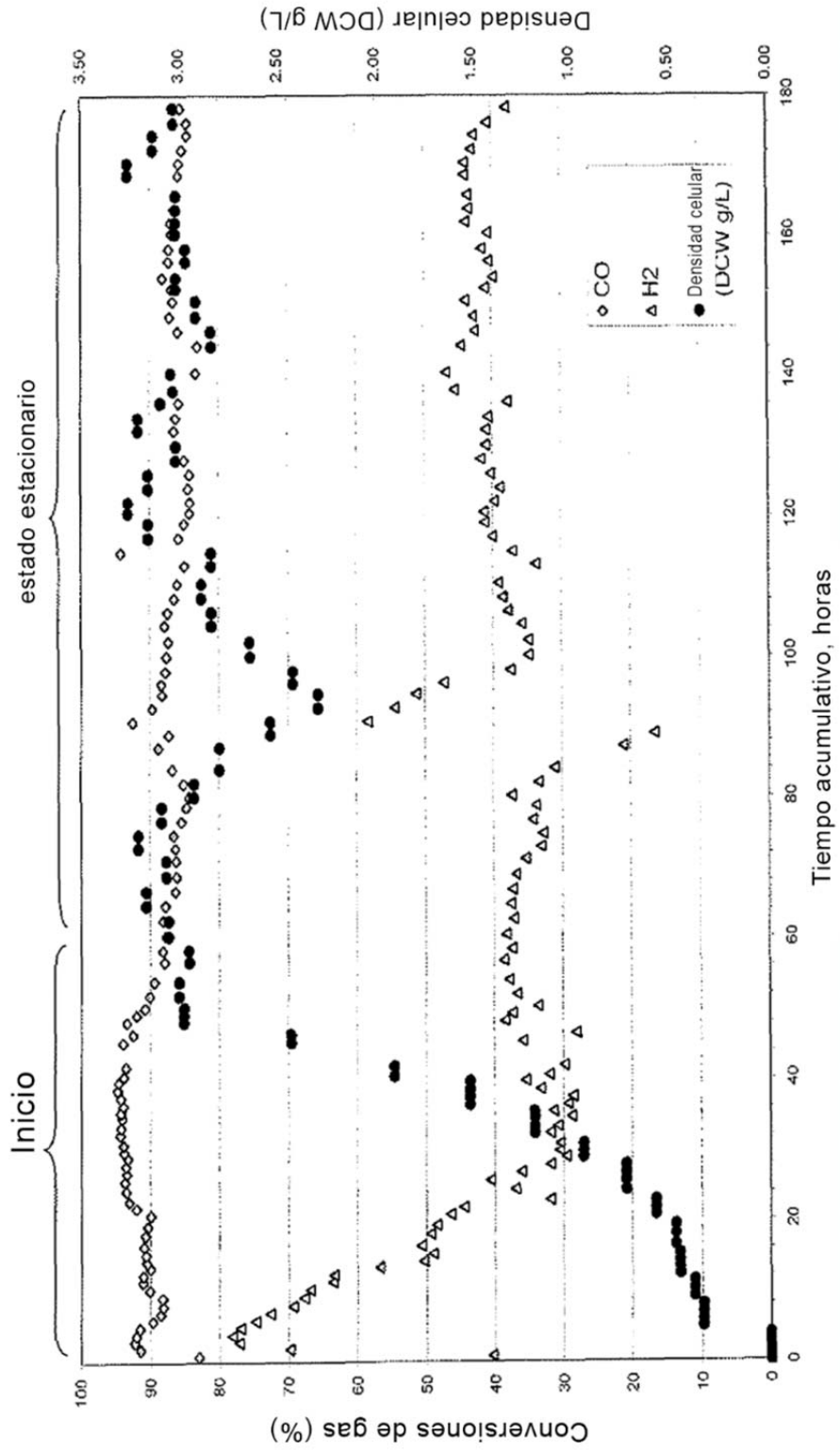


Figura 3

