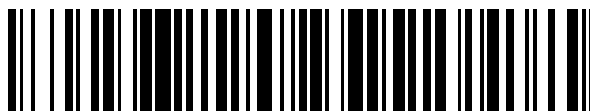


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 510**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/NZ2012/000161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12830218 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2753700**

54 Título: **Proceso de fermentación**

30 Prioridad:

08.09.2011 US 201161532412 P

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

21.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TRAN, LOAN PHUONG y
SIMPSON, SEAN DENNIS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 788 510 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de fermentación

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un método para la producción de lípidos a partir de materia prima gaseosa. El método comprende un sistema de dos etapas para la producción de uno o más productos lipídicos a partir de una materia prima gaseosa.

10

Antecedentes de la invención

La crisis energética mundial ha provocado un mayor interés en enfoques alternativos para la producción de combustibles. Los biocombustibles para transporte son sustitutos atractivos de la gasolina y están penetrando rápidamente en los mercados de combustibles como mezclas de baja concentración. La producción de biocombustibles derivados de biomasa se ha convertido en un enfoque importante para aumentar la producción de energía alternativa y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. La producción de biocombustibles a partir de biomasa permite que la independencia energética mejore el desarrollo de las zonas rurales y el desarrollo económico sostenible.

15

20

Los biocombustibles líquidos de primera generación utilizan materias primas de carbohidratos tales como almidón, caña de azúcar, maíz, colza, soja, palma y aceites vegetales. Las materias primas de primera generación presentan una serie de desafíos importantes. El costo de estas reservas de alimentos con carbohidratos está influenciado por su valor como alimento humano o alimento para animales, mientras que el cultivo de almidón o cultivos productores de sacarosa para la producción de etanol no es económicamente sostenible en todas las geografías. El uso sostenido de estas materias primas como fuente de biocombustibles ejercería inevitablemente una gran presión sobre la tierra cultivable y los recursos hídricos. Por tanto, es interesante desarrollar tecnologías para convertir recursos de carbono de bajo coste y/o más abundantes en combustibles.

25

30

Los biocombustibles de segunda generación son los producidos a partir de celulosa y algas. Las algas se seleccionaron para producir lípidos debido a sus rápidas tasas de crecimiento y la capacidad de las algas para consumir dióxido de carbono y producir oxígeno.

35

Un área que ha visto una mayor actividad es la síntesis microbiana de lípidos que comprenden materias primas necesarias para la producción de biocombustibles. Numerosos estudios han demostrado la capacidad de acumular lípidos mediante el uso de levaduras oleaginosas en diferentes sustratos tales como glicerol industrial, ácido acético, lodos de depuración, permeado de suero, melaza de caña de azúcar e hidrolizado de paja de arroz. Nuevamente estas tecnologías de biocombustibles de segunda generación han encontrado problemas debido a altos costes de producción y costes asociados con transporte y almacenamiento de la materia prima.

40

Hace tiempo que se reconoce que pueden usarse procesos catalíticos para convertir gases que consisten en CO, CO₂, o hidrógeno (H₂) en una variedad de combustibles y productos químicos. Sin embargo, los microorganismos también pueden usarse para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procesos biológicos, aunque generalmente más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procesos catalíticos, incluyendo mayor especificidad, mayores rendimientos, menores costes de energía y mayor resistencia al envenenamiento.

45

Se ha demostrado la producción de ácido acético, acetato y otros productos tales como etanol por fermentación anaerobia de monóxido de carbono y/o hidrógeno y dióxido de carbono. Véase, por ejemplo, Balch *et al.*, (1977) International Journal of Systemic Bacteriology., 27:355-361; Vega *et al.*, (1989) Biotech. Bioeng., 34:785-793; Klasson *et al.* (1990) Appl. Biochem. Biotech., 24/25:1; entre otros.

50

Las bacterias acetogénicas, tales como las del género *Acetobacterium* han demostrado utilizar sustratos que comprenden H₂, CO₂ y/o CO y convertir estos sustratos gaseosos en ácido acético, etanol y otros productos de fermentación por la vía Wood-Ljungdahl con acetil co-A sintasa como enzima clave. *Acetobacterium woodii*, un microorganismo estrictamente anaeróbico, no formador de esporas que crece bien a temperaturas de aproximadamente 30 °C, se ha demostrado que produce acetato a partir de H₂ y CO₂. Balch *et al.* desvelaron en primer lugar que la bacteria *A. woodii* crece por oxidación anaeróbica de hidrógeno y reducción de dióxido de carbono. Buschorn *et al.* mostraron la producción y utilización de etanol por *A. woodii* en glucosa. La fermentación de *A. woodii* se realizó a concentraciones de glucosa (fructosa) de hasta 20 mM. Buschorn *et al.* descubrieron que cuando la concentración de glucosa se incrementó a 40 mM, casi la mitad del sustrato permaneció cuando *A. woodii* entró en fase de crecimiento estacionaria, y apareció etanol como producto de fermentación adicional. Balch *et al.* descubrieron que el único producto principal detectado por la fermentación de H₂ y CO₂ por *A. woodii* fue acetato según la siguiente estequiometría; 4H₂ + 2CO₂ -> CH₃COOH + H₂O.

55

60

65

El documento WO 2011/088364 describe métodos y biorreactores para convertir una fuente de carbono en un lípido;

sin embargo, no describe un método de fermentación en dos etapas que utiliza gases residuales de un proceso industrial como materia prima para producir acetato en un primer paso a una velocidad de al menos 20 g/l/día utilizando *Acetobacterium woodii*.

- 5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de proceso y fermentación que sirva al menos de alguna manera para superar las desventajas anteriores, o al menos proporcionar al público una opción útil.

Sumario de la invención

- 10 La presente invención se refiere a un método para producir lípidos a partir de una corriente gaseosa, comprendiendo el método;

- a. hacer fluir un sustrato que comprende CO₂ y H₂ en un biorreactor primario que contiene un cultivo de *Acetobacterium woodii*;
 15 b. fermentar anaeróbicamente el sustrato que comprende CO₂ y H₂ para producir acetato;
 c. hacer fluir al menos una parte del acetato de (b) a un biorreactor secundario que contiene un cultivo de una o más levaduras; y
 d. fermentar el acetato para producir uno o más lípidos;

- 20 en donde el sustrato que comprende CO₂ y H₂ es un gas residual de un proceso industrial y comprende al menos 40 % de H₂ y al menos 10 % de CO₂, y en donde el acetato se produce a una tasa de al menos aproximadamente 20 g/l/día.

- El sustrato gaseoso deriva de una fuente industrial. En ciertas realizaciones se mezclan uno o más gases de una o más fuentes industriales para proporcionar un sustrato gaseoso con una composición deseada.

En una realización de la invención, el pH de la fermentación en el biorreactor primario se mantiene entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8. En una realización preferente el pH se mantiene a pH 7.

- 30 En una realización los lípidos producidos se usan para producir uno o más productos terciarios. En una realización el uno o más productos terciarios se seleccionan del grupo que comprende etanol y biodiesel.

También se describe un método para producir uno o más productos por fermentación microbiana anaeróbica, comprendiendo el método;

- 35 i. recibir un sustrato que comprende CO₂ y H₂ en un primer biorreactor primario que contiene un cultivo de uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Acetobacterium*, *Moorella*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina*, y *Desulfotomaculum*; y fermentar anaeróbicamente el sustrato por etapas para producir un caldo de fermentación que comprende acetato

- 40 ii. alimentar el caldo de fermentación a un biorreactor secundario que contiene un cultivo de una o más levaduras; y

- 45 iii) fermentar acetato para producir uno o más productos lipídicos.

En una realización el caldo de fermentación combinado se procesa para retirar al menos una parte del acetato antes de que la corriente se alimente al biorreactor secundario.

- 50 Se entenderá que las siguientes realizaciones pueden aplicarse a cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

En una realización el pH de la corriente de fermentación combinada se ajusta entre pH 6 y pH 8 antes de alimentarse al biorreactor secundario.

- 55 En una realización la relación de ácido acético a nitrógeno en el caldo de fermentación en el biorreactor secundario es al menos 10:1. En una realización la relación de carbono a ácido acético en el caldo de fermentación del biorreactor secundario es 49:1. En una realización de la invención, la corriente de ácido que sale del primer biorreactor se trata para proporcionar una corriente de ácido purificada o concentrada para pasarse al segundo biorreactor. En una realización de la invención se monitoriza la relación carbono:nitrógeno del caldo de fermentación en el segundo
 60 biorreactor, y se ajusta la entrada de carbono y nitrógeno al biorreactor para garantizar una relación carbono: nitrógeno mayor que 49:1

- En una realización de la invención el acetato producido en el biorreactor primario tiene una concentración de al menos aproximadamente 5 g/l o al menos aproximadamente 10 g/l, o al menos aproximadamente 15 g/l o al menos
 65 aproximadamente 20 g/l.

La velocidad de producción de acetato en el biorreactor primario es de al menos aproximadamente 20 g/l/día o al menos aproximadamente 40 g/l/día o al menos aproximadamente 60 g/l/día.

5 En una realización de la invención, las una o más levaduras son levadura oleaginosas. En una realización de la invención la levadura oleaginosas se selecciona del grupo que comprende *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*. En una realización preferente las una o más levaduras son *Cryptococcus curvatus*.

10 En una realización de la invención el pH de la fermentación en el biorreactor secundario se mantiene entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8. En una realización preferente el pH se mantiene a pH 7.

15 En una realización de la invención el pH en el biorreactor secundario es sustancialmente el mismo que el pH en el biorreactor primario. En realizaciones alternativas, el pH de la corriente que sale del biorreactor primario se ajusta a aproximadamente pH 7 antes de alimentarse al biorreactor secundario.

20 En una realización de la invención la concentración de lípidos en el segundo biorreactor es al menos aproximadamente al menos 10 g/l o al menos aproximadamente 20 g/l, o al menos aproximadamente 40 g/l, o al menos aproximadamente 60 g/l, o al menos aproximadamente 80 g/l, o al menos aproximadamente 100 g/l, o al menos aproximadamente 150 g/l. En una realización de la invención, la tasa de producción de lípidos en el segundo biorreactor es al menos aproximadamente 5 g/l/día, o al menos aproximadamente 7 g/l/día, o al menos aproximadamente 10 g/l/día, o aproximadamente 15 g/l/día, o al menos aproximadamente 20 g/l/día, o al menos aproximadamente 30 g/l/día.

25 En una realización de la invención, el método es una fermentación continua en dos etapas. En una realización, el método es una fermentación semicontinua en dos etapas.

30 En una realización todo el acetato producido en el biorreactor primario se transfiere al biorreactor secundario para su fermentación a lípidos.

35 En una realización, al menos una parte del acetato producido en el biorreactor primario se recupera.

40 En una realización, al menos una parte de la corriente que sale del biorreactor secundario se recicla a un reactor primario. En una realización, la corriente de salida se procesa para retirar sustancialmente toda la biomasa antes de pasar al reactor primario. En ciertas realizaciones la corriente de salida se trata adicionalmente para eliminar proteínas solubles y otros componentes no deseados. En otras realizaciones el pH de la corriente se ajusta antes de alimentarse al reactor primario.

45 En una realización los lípidos producidos en el biorreactor secundario se usan para producir uno o más productos terciarios. En una realización los uno o más productos terciarios se seleccionan del grupo que comprende etanol, biodiesel, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE).

50 En una realización se usa una serie de reactores primarios para alimentar al menos un reactor secundario. Por ejemplo, tres reactores primarios para alimentar un reactor secundario, cuatro reactores primarios que alimentan dos reactores secundarios, etc.

55 En una realización el sustrato gaseoso es un gas residual o de escape de un proceso industrial. En una realización el gas residual se selecciona del grupo que comprende gas residual de una planta de hidrógeno, gas de horno de coque, gas natural, gas de horno de coque, gas natural, gas de reformado catalítico, gas de escape de craqueo de nafta, gas combustible de refinería, gases residuales de planta de metanol, gases residuales de planta de amoníaco, y gases de horno de cal.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con más detalle y por referencia a las figuras adjuntas, en donde:

55 la Figura 1 es un sistema de dos fermentadores para la producción de lípidos a partir de CO₂ y H₂ según la presente invención.

La Figura 2 muestra la producción de acetato a partir de CO₂ y H₂ según una realización de la presente invención.

60 La Figura 3a muestra el crecimiento de *C. curvatus* utilizando un sustrato de glucosa.

La Figura 3b muestra el crecimiento de *C. curvatus* utilizando un sustrato de acetato a partir de un proceso de fermentación de CO₂/H₂ según la presente invención.

65 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los siguientes términos como se utilizan en esta memoria descriptiva se definen de la siguiente manera:

- 5 Permeado - constituyentes sustancialmente solubles del caldo que pasan a través del separador y no se retienen por el separador. El permeado contendrá típicamente productos de fermentación solubles, subproductos y solución de nutrientes.
- 10 Tasa de dilución - tasa de reemplazo del caldo en un biorreactor. La tasa de dilución se mide en el número de volúmenes de biorreactor de caldo que se reemplazan por medio nutriente por día.
- Caldo de fermentación o caldo - la mezcla de componentes (incluido el cultivo de caldo y el medio nutriente) que se encuentra en el biorreactor.
- 15 Medio nutriente - la solución agregada al caldo de fermentación que contiene nutrientes y otros componentes apropiados para el crecimiento del cultivo de microorganismos.
- 20 Sustrato que comprende monóxido de carbono - y términos similares debe entenderse que incluyen cualquier sustrato en donde el monóxido de carbono está disponible para una o más cepas de bacterias para crecimiento y/o fermentación, por ejemplo.
- Sangrado de caldo - la parte del caldo de fermentación extraída de un biorreactor que no se pasa a un separador.
- 25 Cultivo de caldo - el cultivo de microorganismos presente en el caldo de fermentación.
- Densidad de cultivo de caldo - la densidad de células de microorganismos en el caldo de fermentación.
- 30 Separador - un módulo que está adaptado para recibir el caldo de fermentación de un biorreactor y pasar el caldo a través de un filtro para producir un retentado y un permeado. El filtro puede ser una membrana, por ejemplo, una membrana de flujo cruzado o una membrana de fibra hueca.
- 35 Sustrato gaseoso que comprende dióxido de carbono e hidrógeno - y términos similares incluyen cualquier gas que incluya dióxido de carbono e hidrógeno. El dióxido de carbono y el hidrógeno pueden estar presentes en proporciones variables, es decir, sustancialmente el mismo % de ambos, o más hidrógeno, o más dióxido de carbono.
- 40 Ácido - como se usa en este documento, este término 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 este documento. La relación de ácido molecular a carboxilato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema. El término "acetato" incluye tanto la sal de acetato sola como una mezcla de ácido acético molecular o libre y sal de acetato, tal como la mezcla de sal de acetato y ácido acético libre presente en un caldo de fermentación como puede describirse en este documento. La relación de ácido acético molecular a acetato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema.
- 45 Los lípidos que se usan en este documento incluyen ácidos grasos, glucolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos, lípidos de esteroides y lípidos de prenil.
- 50 Biorreactor o fermentador - incluye un dispositivo de fermentación que consiste de uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías, que incluye el reactor continuo de tanque agitado (CSTR), el reactor celular inmovilizado (ICR), el reactor de lecho percolador (TBR), el reactor de película biológica de lecho en movimiento (MBBR), columna de burbujeo, fermentador de elevación de gases, reactor de membrana, tal como el biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR), mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto de gas-líquido.
- 55 Biorreactor primario - como se usa en este documento, este término pretende abarcar uno o más reactores que pueden conectarse en serie de paralelo con un biorreactor secundario. Los biorreactores primarios utilizan fermentación anaerobia para producir ácidos a partir de un sustrato gaseoso. Al menos una parte del producto ácido de uno o más biorreactores primarios se usa como sustrato en uno o más biorreactores secundarios.
- 60 Biorreactor secundario - como se usa en este documento, estos términos pretenden abarcar cualquier número de biorreactores adicionales que pueden conectarse en serie o en paralelo con los biorreactores primarios. Cualquiera de estos biorreactores adicionales también puede conectarse a un separador adicional.
- 65 Fermentar, proceso de fermentación o reacción de fermentación - y los términos similares usados en este documento, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del proceso. Como se describe además en este documento, en algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Por tanto, debe entenderse que la adición de metales o

composiciones a una reacción de fermentación incluye la adición a uno o ambos de estos reactores.

Los procesos de producción de ácidos por fermentación anaerobia de sustratos gaseosos se conocen en la técnica.

5 Como se ha definido anteriormente, la invención se refiere a procesos de producción de productos lipídicos a partir de sustratos gaseosos usando un proceso de fermentación en dos etapas. En una primera etapa un sustrato gaseoso que comprende CO₂ y H₂ se fermenta anaeróbicamente para producir acetato. En una segunda etapa del proceso, el acetato de la primera etapa se alimenta a un segundo biorreactor que contiene un cultivo de una o más levaduras. El acetato se fermenta aeróbicamente para producir uno o más productos lipídicos.

10 El proceso de la invención comprende, cultivar, en un biorreactor primario que contiene un medio nutriente líquido, una o más cepas de bacterias anaerobias, acetogénicas que son capaces de producir acetato a partir de un sustrato que contiene CO₂ y H₂ y suministrar dicho sustrato gaseoso al biorreactor. El proceso de fermentación produce acetato. El acetato producido en el biorreactor primario se alimenta a un biorreactor secundario que contiene un cultivo de una o más levaduras oleaginosas, capaces de producir lípidos a partir de un sustrato que contiene acetato.

15 Las cepas de bacterias acetogénicas anaeróbicas capaces de producir acetato a partir de un sustrato que contiene CO₂ y H₂ son del grupo que consiste en *Acetobacterium*, *Moorella*, *Clostridium*, *Pyrococcus*, *Eubacterium*, *Desulfobacterium*, *Carboxydotherrmus*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobium*, *Butyribacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Oxobacter* y *Methanosarcina*. El método de la invención emplea la bacteria *Acetobacterium woodii*.

25 La eficacia de los procesos de fermentación de los diversos aspectos de la invención puede mejorarse adicionalmente mediante un proceso adicional de reciclaje de una corriente que sale del biorreactor secundario a al menos un reactor primario. La corriente que sale del biorreactor secundario puede contener metales no utilizados, sales y otros componentes nutritivos. Al reciclar la corriente de salida a un reactor primario, puede reducirse el coste de proporcionar un medio nutriente continuo al reactor primario. Este paso de reciclaje tiene el beneficio adicional de reducir los requisitos de agua del proceso de fermentación continua. La corriente que sale del biorreactor puede tratarse antes de volver a pasar a un reactor primario. En algunas realizaciones preferentes, la biomasa se separa y procesa para recuperar uno o más productos lipídicos. La corriente sustancialmente libre de biomasa puede pasar luego a un reactor primario. Alternativamente la corriente libre de biomasa puede tratarse adicionalmente para eliminar proteínas solubles u otros componentes no deseados antes de pasar al reactor primario. Pueden añadirse metales y sales adicionales a la corriente que retorna al reactor primario para proporcionar una corriente de nutrientes que tenga una composición deseada. El pH de la corriente se controla y ajusta según el proceso de fermentación que ocurre en el reactor primario.

35 **Fermentación utilizando un sustrato de dióxido de carbono e hidrógeno.**

La invención tiene una aplicabilidad particular para apoyar la producción de acetato y etanol a partir de sustratos gaseosos tales como gases de combustión industriales que contienen CO₂ y H₂. Uno de tales tipos de corriente de gas son los gases de escape de las plantas de producción de hidrógeno, que típicamente contienen 50-60 % de CO₂, 20-30 % de H₂, 5-15 % de CO y 5-15 % de CH₄. Otro proceso industrial que resulta en un gas residual rico en CO₂ y H₂ es la fabricación de amoníaco. Se producen flujos similares a partir del procesamiento de cualquier materia prima basada en carbono, tal como petróleo, carbón, y biomasa. La invención también es aplicable a reacciones que producen alcoholes alternativos.

45 Se conocen procesos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos. Los procesos ejemplares incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, Patente US 6.340.581, Patente US 6.136.577, Patente US 5.593.886, Patente US 5.807.722 y Patente US 5.821.111.

50 Se sabe que varias bacterias anaerobias son capaces de llevar a cabo la fermentación de CO₂ y H₂ a alcoholes, incluyendo etanol y ácido acético, y son adecuadas para su uso en los procesos descritos en este documento. Los acetógenos tienen la capacidad de convertir sustratos gaseosos tales como H₂, CO₂ y CO en productos que incluyen ácido acético, etanol y otros productos de fermentación por la vía Wood-Ljungdahl. Ejemplos de tales bacterias que son adecuadas para su uso en los procesos descritos en este documento incluyen las del género *Acetobacterium*, tales como cepas de *Acetobacterium woodii* ((Dernier, M., Weuster-Botz, "Reaction Engineering Analysis of Hydrogenotrophic Production of Acetic Acid by Acetobacterum Woodii", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108, n.º 2, Febrero de 2011).

60 Se ha mostrado que *Acetobacterium woodii* produce acetato por fermentación de sustratos gaseosos que comprenden CO₂ y H₂. Buschhorn *et al.* demostraron la capacidad de *A. woodii* para producir etanol en una fermentación de glucosa con limitación de fosfato.

65 Otras bacterias adecuadas incluyen las del género *Moorella*, incluyendo *Moorella sp* HUC22-1, (Sakai *et al.*, Biotechnology Letters 29: pág. 1607-1612), y las del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G. *et al.* (1991), Systematic and Applied Microbiology 14:254-260). Otros ejemplos incluyen *Morelia thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Ruminococcus productus*, *Acetobacterium woodii*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Oxobacterpfennigii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Desulfotomaculum*

kuznetsovii (Simpa *et al.* Critical Reviews in Biotechnology, 2006 Vol. 26. pág. 41-65). Además, debe entenderse que otras bacterias anaeróbicas acetogénicas pueden ser aplicables a los procesos descritos en este documento como entendería un experto en la materia. También se entenderá que los procesos descritos en este documento pueden aplicarse a un cultivo mixto de dos o más bacterias.

5 Un microorganismo ejemplar adecuado para su uso en la presente invención es *Acetobacterium woodii* que tiene las características de identificación de la cepa depositada en el Centro de Recursos Alemanes para Material Biológico (DSMZ) con el número de depósito de identificación DSM 1030.

10 El cultivo de las bacterias usadas en un método de la invención puede realizarse usando cualquier número de procesos conocidos en la técnica para cultivar y fermentar sustratos usando bacterias anaerobias. **Se proporcionan técnicas ejemplares en la sección "Ejemplos" posterior.** A modo de ejemplo adicional, pueden utilizarse los procesos descritos generalmente en los siguientes artículos que usan sustratos gaseosos para la fermentación: M. Dernier y D.Weuster-Botz (2010). Reaction Engineering Analysis of Hydrogenotrophic Production of Acetic Acid by
15 *Acetobacterium woodii*. Biotechnology and Bioengineering 2010; D.R. Martin, A. Misra y H. L. Drake (1985). Dissimilation of Carbon Monoxide to Acetic Acid by Glucose-Limited Cultures of *Clostridium thermoaceticum*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 49, n.º 6, páginas 1412-1417. Normalmente, la fermentación se realiza en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de tanque agitado continuo (CTSR), un reactor de columna de burbujas (BCR) o un reactor de lecho de goteo (TBR). Además, en algunas realizaciones de la divulgación, el
20 biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en donde se cultivan los microorganismos, y un segundo reactor de fermentación, al que se alimenta el caldo de fermentación del reactor de crecimiento y en donde se produce la mayor parte del producto de fermentación (etanol y acetato).

25 **Sustrato que contiene CO₂ y H₂**

La fuente de carbono para la fermentación es un sustrato gaseoso que comprende dióxido de carbono en combinación con hidrógeno. El sustrato gaseoso es un gas residual que contiene CO₂ y H₂ obtenido de un proceso industrial. La mayor fuente de emisiones de CO₂ a nivel mundial proviene de la combustión de combustibles fósiles tales como carbón, petróleo y gas en centrales eléctricas, instalaciones industriales, y otras fuentes.

30 En ciertas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de hidrógeno, fabricación de amoníaco, combustión de combustibles, gasificación de carbón, y producción de caliza y cemento.

El sustrato gaseoso puede ser el resultado de mezclar uno o más sustratos gaseosos para proporcionar una corriente combinada. El experto entenderá que las corrientes de gas residual ricas en H₂ o ricas en CO₂ son más abundantes que las corrientes de gas residual ricas tanto en H₂ como en CO₂. El experto entenderá que mezclar una o más corrientes de gas que comprenden uno de los componentes deseados de CO₂ y H₂ estaría dentro del ámbito de la presente invención.

40 Las corrientes de gas ricas en hidrógeno se producen mediante una diversidad de procesos incluyendo reforma con vapor de hidrocarburos, y en particular reforma con vapor de gas natural. La oxidación parcial de carbón o hidrocarburos también es una fuente de gas rico en hidrógeno. Otras fuentes de gas rico en hidrógeno incluyen electrólisis de agua, subproductos de células electrolíticas utilizadas para producir cloro y de diversas corrientes químicas y de refinería.

45 Las corrientes de gas típicamente ricas en dióxido de carbono incluyen gases de escape de combustión de un hidrocarburo, tal como gas natural o petróleo. El dióxido de carbono también se produce como subproducto de la producción de amoníaco, caliza o fosfato y de pozos de dióxido de carbono natural.

50 **Mezcla de corrientes**

Como se indicó previamente, puede ser deseable combinar una corriente de desechos industriales con una o más corrientes adicionales para mejorar la eficacia, producción de ácido y/o alcohol y/o captura general de carbono de la reacción de fermentación.

55 Por tanto, cuando las corrientes industriales tienen alto contenido de CO₂, pero incluyen una cantidad mínima o nada de H₂, puede ser deseable mezclar una o más corrientes que comprenden H₂ con la corriente residual que comprende CO₂, antes de proporcionar la corriente de sustrato mezclada al fermentador. La eficacia general, productividad del alcohol y/o captura general de carbono de la fermentación dependerán de la estequiometría de CO₂ y H₂ en la corriente mezclada. Sin embargo, en realizaciones particulares, la corriente mezclada puede comprender sustancialmente CO₂
60 y H₂ en las siguientes relaciones molares: al menos 1:2 al menos 1:4 o al menos 1:6 o al menos 1:8 o al menos 1:10.

La combinación de corrientes también puede tener otras ventajas, particularmente en casos donde una corriente residual que comprende CO₂y/o H₂ es de naturaleza intermitente. Por ejemplo, una corriente residual intermitente que comprende CO₂ y o H₂ puede mezclarse con una corriente sustancialmente continua que comprende CO₂y/o H₂ y suministrarse al fermentador. En realizaciones particulares de la invención, la composición y caudal de la corriente

sustancialmente continua pueden variarse según la corriente intermitente para mantener la provisión de una corriente de sustrato de composición y caudal sustancialmente continuos al fermentador.

5 La combinación de dos o más corrientes para lograr una composición deseable puede implicar caudales variables de todas las corrientes, o una o más corrientes pueden mantenerse constantes mientras que otras corrientes se varían para "recortar" u optimizar la corriente del sustrato a la composición deseada. Para corrientes que se procesan continuamente, puede ser necesario poco o ningún tratamiento adicional (tal como tamponamiento) y la corriente se puede proporcionar al fermentador directamente. Sin embargo, puede ser necesario proporcionar almacenamiento intermedio para corrientes en donde uno o más están disponibles de manera intermitente, y/o cuando las corrientes
10 están disponibles continuamente, pero se usan y/o producen a tasas variables.

Los expertos en la materia entenderán que será necesario controlar la composición y caudales de las corrientes antes de la mezcla. El control de la composición de la corriente mezclada puede conseguirse variando las proporciones de las corrientes constituyentes para lograr una composición objetivo o deseable. Por ejemplo, una corriente de gas de
15 carga base puede tener principalmente CO₂ y una corriente de gas secundaria que comprende una alta concentración de H₂ pueden mezclarse para conseguir una relación específica H₂:CO₂. La composición y caudal de la corriente mezclada se pueden controlar por cualquier medio conocido en la técnica. El caudal de la corriente mezclada puede controlarse independientemente de la operación de mezcla; sin embargo, las velocidades a las que se pueden extraer las corrientes constituyentes individuales deben controlarse dentro de límites. Por ejemplo, una corriente producida
20 intermitentemente, extraída continuamente de almacenamiento intermedio, debe extraerse a una velocidad tal que la capacidad de almacenamiento intermedio no se agote ni se llene hasta su capacidad.

En el punto de mezcla, los gases constituyentes individuales entrarán en una cámara de mezcla, que normalmente será un recipiente pequeño o una sección de tubería. En tales casos, el recipiente o tubería puede estar provisto de
25 dispositivos de mezcla estática, tales como deflectores, dispuestos para promover turbulencia y rápida homogeneización de los componentes individuales.

El almacenamiento intermedio de la secuencia combinada también se puede proporcionar, si fuera necesario, para
30 mantener la provisión de una corriente de sustrato sustancialmente continua al biorreactor.

Un procesador adaptado para controlar la composición y caudales de las corrientes constituyentes y controlar la combinación de las corrientes en proporciones apropiadas, para lograr la mezcla requerida o deseable, se puede incorporar opcionalmente en el sistema. Por ejemplo, pueden proporcionarse componentes particulares de la manera
35 requerida o disponible para optimizar la eficacia de productividad de alcohol y/o la captura general de carbono.

En determinados aspectos, el sistema está adaptado para controlar continuamente los caudales y composiciones de al menos dos corrientes y combinarlos para producir una única corriente de sustrato combinada de composición óptima, y medios para pasar la corriente de sustrato optimizada al fermentador.

40 A modo de ejemplo no limitante, realizaciones particulares de la invención implican la utilización de dióxido de carbono gaseoso a partir de la producción de cal o cemento como fuente de CO₂. Normalmente, tales corrientes contienen poco o nada de H₂, por tanto, puede ser deseable combinar la corriente que comprende CO₂ con una corriente que comprende H₂ para lograr una relación CO₂:H₂ más deseable. H₂ a menudo se produce en grandes cantidades en una acería en el horno de coque. Por tanto, una corriente residual del horno de coque que comprende H₂ puede mezclarse
45 con una corriente residual de horno de caliza que comprende CO₂ para lograr una composición deseable.

Otras fuentes de CO₂ y/o H₂ que pueden mezclarse para formar una corriente de sustrato de CO₂/H₂ incluyen síntesis de amoníaco y urea.

50 En otras realizaciones de la divulgación, el sustrato gaseoso también puede ser un gas residual que contiene CO₂ y H₂ obtenido de alguna otra fuente tal como gases de escape de automóviles. En estas realizaciones, el gas que contiene CO₂ y H₂ puede capturarse del proceso industrial antes de emitirse a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. Dependiendo de la composición del sustrato gaseoso que contiene CO₂ y H₂, también puede ser deseable tratarlo para retirar cualquier impureza no deseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo en la
55 fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o lavarse usando métodos conocidos.

El sustrato que contiene CO₂ y H₂ también puede proceder de procesos de fermentación en donde se fermentan carbohidratos o gases para formar productos tales como etanol. Por ejemplo, la fermentación anaerobia de un sustrato gaseoso que comprende CO por microorganismos del género *Clostridium* da como resultado la producción de
60 productos que incluyen etanol. CO₂ y opcionalmente hidrógeno son subproductos de la reacción de fermentación.

En la presente invención, el sustrato que comprende CO₂ deriva de residuos que contienen carbono, por ejemplo, gases residuales industriales o de la gasificación de otros residuos. Por tanto, los métodos de la invención representan procesos eficaces para capturar carbono que de otro modo se expulsaría al medio ambiente. En ciertas realizaciones,
65 los métodos proporcionan procesos mejorados para capturar CO₂ por conversión en productos útiles tales como ácidos y/o alcoholes.

El sustrato que contiene CO₂ y H₂ contiene al menos 40 % de H₂ en volumen, tal como al menos 50 % de H₂ en volumen, o al menos 60 % de H₂ en volumen, o al menos 70 % de H₂ en volumen, o al menos 80 % de H₂ en volumen, o al menos 85 % de H₂ en volumen.

5 El sustrato gaseoso contiene al menos 10 % de CO₂ en volumen, tal como al menos 15 % de CO₂ en volumen, o al menos 20 % de CO₂ en volumen, o al menos 25 % de CO₂ en volumen, o al menos 30 % de CO₂ en volumen, o al menos 40 % de CO₂ en volumen.

10 Los métodos para separar CO₂ de otros componentes gaseosos se conocen bien. Las tecnologías de separación pueden clasificarse en tres categorías generales; postcombustión, precombustión y oxicomcombustible. Las tecnologías de postcombustión usan disolventes para absorber CO₂ del gas de combustión después de la combustión. Las tecnologías de precombustión separan el CO₂ del combustible de alimentación, usando procesos bien conocidos tales como gasificación de hidrocarburos y la reacción de intercambio de agua, y usa el gas hidrógeno restante como combustible. Las plantas de oxicomcombustible reemplazan el aire con oxígeno puro en la cámara de combustión. Cuando se queman con oxígeno puro, los hidrocarburos emiten una corriente casi pura de CO₂ y vapor, facilitando la separación final de CO₂.

20 El experto entenderá que, una corriente de hidrocarburos puede pasarse a través de una serie de procesos para producir el sustrato que comprende CO₂ y H₂. Por ejemplo, según un aspecto de la divulgación una corriente de hidrocarburos (CH₄) pasa a través de un reformador de metano con vapor para producir una corriente de gas que comprende al menos CO y H₂; la corriente de gas luego experimenta una reacción de intercambio de gas agua para producir un sustrato que comprende CO, CO₂ y H₂. El sustrato se puede pasar a través de un adsorbedor de oscilación de presión (PSA) para separar al menos una parte de los gases. Se entenderá que puede usarse más de una etapa de PSA para permitir la separación de diferentes componentes de la corriente de gas.

25 Como entenderá el experto, el componente de CO₂ del sustrato y el componente de H₂ de la corriente de gas puede derivar de fuentes distintas. El componente de CO₂ puede derivar de una corriente de gas residual industrial típicamente rica en dióxido de carbono, y el hidrógeno de una fuente alternativa puede mezclarse con el CO₂ para producir un sustrato de CO₂ y H₂ que tiene la composición deseada. Pueden usarse técnicas de separación conocidas para separar los componentes deseados de cada gas residual industrial, y los componentes deseados pueden mezclarse para formar el sustrato que comprende CO₂ y H₂.

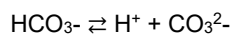
30 Típicamente el dióxido de carbono se agregará a la reacción de fermentación en estado gaseoso. Sin embargo, los métodos de la divulgación no se limitan a la adición de dióxido de carbono en este estado. El dióxido de carbono es fácilmente soluble en agua. A temperatura ambiente, la solubilidad del CO₂ es de aproximadamente 90 cm³ de CO₂ por 100 ml de agua. El dióxido de carbono existe en muchas formas en solución acuosa. Cuando se añade a una solución acuosa, el CO₂ se disuelve.



Después se establece un equilibrio entre el CO₂ disuelto e hidrogenocarbonato;



El hidrogenocarbonato se disocia a continuación;



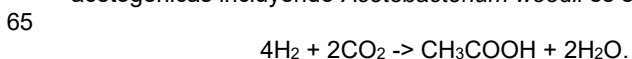
50 La cantidad de las diversas formas de dióxido de carbono presentes en la solución acuosa depende de factores que incluyen el pH de la solución, así como las condiciones de presión y temperatura. La presencia de otros iones en solución también puede afectar a la cantidad de diferentes formas de dióxido de carbono presentes en solución.

55 El experto entenderá que en algunas realizaciones descritas en este documento (pero que quedan fuera del ámbito de las reivindicaciones) se podría proporcionar dióxido de carbono a la fermentación en forma acuosa. El experto también entenderá que sería posible proporcionar CO₂ a la reacción de fermentación en forma gaseosa y acuosa.

Estequiometría de la reacción

60 Se ha demostrado que las bacterias anaerobias producen etanol y ácido acético a partir de CO, CO₂ y H₂ a través de la vía bioquímica de Acetil-CoA.

La estequiometría para la formación de acetato a partir de un sustrato que comprende H₂ y CO₂ mediante bacterias acetogénicas incluyendo *Acetobacterium woodii* es el siguiente (Balch *et al.*, 1977):



Para que se produzca el crecimiento de bacterias y fermentación de CO₂ y H₂ a ácido y/o alcohol, además del gas sustrato que contiene CO₂ y H₂, 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.

5 Se conocen en la técnica medios anaeróbicos adecuados para la fermentación de acetato y/o etanol usando CO₂ como única fuente de carbono. Por ejemplo, se describen medios adecuados en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.807.722 y 6.340.581. La presente descripción proporciona un medio novedoso que tiene una eficacia incrementada para ayudar al crecimiento de los microorganismos y/o la producción de alcohol en el proceso de fermentación. Estos medios se describirán con más detalle posteriormente.

10 La fermentación debe realizarse deseablemente en condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación de CO₂ y H₂ a acetato y/o etanol. Las condiciones de reacción que deben considerarse 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 tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato gaseoso para garantizar que CO₂

15 en la fase líquida no se vuelva limitante, y concentraciones máximas del producto para evitar inhibición del producto. Las condiciones adecuadas se describen en los documentos W002/08438, WO07/117157 y W008/115080.

Las condiciones óptimas de reacción dependerán en parte del microorganismo particular utilizado. Sin embargo, en general, es preferente que la fermentación se realice a una presión superior a la presión ambiente. Operar a presiones

20 aumentadas permite un aumento significativo en la tasa de transferencia de CO₂ de la fase gaseosa a la fase líquida, donde puede absorberse 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 de gas de entrada) se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de presión atmosférica.

25 También es deseable que la tasa de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO₂ y H₂ sea tal que asegure que la concentración de CO₂ y H₂ en la fase líquida no se vuelva limitante. Esto se debe a que una consecuencia de las condiciones limitadas de CO₂ y H₂ puede ser que el cultivo consuma el producto de etanol.

30 La temperatura óptima para el crecimiento más rápido de bacterias, y la tasa de producción más alta de acetato se determinó ejecutando el fermentador en un intervalo de diferentes puntos de temperatura. El fermentador se ejecutó inicialmente a 30 °C, y la temperatura se incrementó a varias temperaturas diferentes. Sorprendentemente, se descubrió que la temperatura óptima para el crecimiento más rápido de bacterias era de al menos 32 °C, o al menos 33 °C, o al menos 34 °C, o al menos 35 °C, o al menos 36 °C.

Fermentación de levadura utilizando ácidos como sustrato.

La invención tiene aplicabilidad particular para ayudar a la producción de lípidos a partir de sustratos que contienen acetato. Uno de esos tipos de sustrato es el acetato derivado de la conversión de gases H₂ y CO₂ mediante

40 fermentación microbiana anaerobia.

Se conocen procesos para la producción de lípidos a partir de fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, lactosa, glicerol y etanol (Chi *et al.*, "Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production" International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 36, 2011, pág. 9542-9550.) Procesos ejemplares incluyen los descritos, por ejemplo, por Chi *et al.*

45

Se sabe que varias levaduras oleaginosas son capaces de realizar la fermentación de azúcares a lípidos, y son adecuadas para su uso en el proceso de la presente invención. Ejemplos de tales levaduras que son adecuadas para usar en la invención incluyen las del género *Cryptococcus*, tales como cepas de *Cryptococcus curvatus* (también conocida como *Candida curvatus*) (Chi *et al.*)

50

Se ha mostrado que *Cryptococcus curvatus* produce lípidos por fermentación de sustratos que comprenden acetato. Chi *et al.* demostraron la capacidad de *C. curvatus* para producir lípidos en la fermentación de acetato.

55 La producción de lípidos mediante fermentación de *C. curvatus* se ha demostrado que se mejora por limitación de nitrógeno. Se ha demostrado que una relación de carbono a nitrógeno de 49:1 tiene un impacto significativo en la producción de lípidos. Se sabe que *C. curvatus* crece en varias fuentes de carbono, incluyendo glucosa, acetato y etanol. El pH ideal para el crecimiento de *C. curvatus* es pH 7.

60 La capacidad de *C. curvatus* para crecer en acetato y etanol, hace de las corrientes de producto del proceso de fermentación de CO₂/H₂ descrito en este documento, sustratos de fermentación ideales para las fermentaciones de levadura. La corriente de producto de la fermentación de CO₂/H₂ es particularmente ideal, ya que es rica en acetato y tiene un pH de aproximadamente pH 7.

65 Otras levaduras adecuadas incluyen las de los géneros, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*. Además, debe entenderse que otras levaduras oleaginosas pueden ser aplicables a la

presente invención como entendería un experto en la materia. También se entenderá que la invención se puede aplicar a un cultivo mixto de dos o más levaduras.

Se entenderá que otras bacterias u hongos oleaginosos, incluyendo las del grupo seleccionado de *Blakeslea*, *Cryptococcus*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Pythium*, *Thraustochytrium* y *Trichosporon*, también pueden ser aplicables a la presente invención.

El cultivo de la levadura usada en un método de la invención puede realizarse usando cualquier número de procesos conocidos en la técnica para cultivar y fermentar sustratos usando levaduras oleaginosas.

Normalmente, la fermentación se realiza en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de tanque agitado continuo (CTSR), un reactor de columna de burbujas (BCR) o un reactor de lecho de goteo (TBR). Además, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en donde se cultivan los microorganismos, y un segundo reactor de fermentación, al que se alimenta el caldo de fermentación del reactor de crecimiento y en donde se produce la mayor parte del producto de fermentación (lípidos). Los métodos y sistemas de la invención se describen en este documento por referencia a las Figuras.

La Figura 1 muestra un sistema de dos etapas para la producción de lípidos a partir de una corriente gaseosa que comprende CO₂ y H₂. El sistema proporciona un biorreactor primario 101 que tiene una entrada de medio 102, un puerto de entrada de gas 103, un medio separador 104, una salida de corriente de permeado 107, y una salida de corriente de sangrado 108. El biorreactor primario está conectado a un biorreactor secundario 201, que tiene un separador 205, una salida de corriente de permeado 207 y una salida de corriente de sangrado 208.

Cuando está en uso, el biorreactor primario 101 contiene caldo de fermentación que comprende un cultivo de una o más bacterias acetogénicas en un medio nutriente líquido. Se añade medio al biorreactor 101 de manera continua o semicontinua a través de la entrada de medios 102. Se suministra un sustrato gaseoso al biorreactor 101 a través del puerto de entrada de gas 103. El medio separador está adaptado para recibir al menos una parte de caldo del biorreactor 101 a través de un primer conducto de salida 104 y pasarlo a través del separador 105 configurado para separar sustancialmente las células del microorganismo (el retentato) del resto del caldo de fermentación (el permeado). Al menos una parte del retentato se devuelve al primer biorreactor a través de un primer conducto de retorno 106 que asegura que la densidad del cultivo del caldo se mantenga a un nivel óptimo. El separador 105 está adaptado para pasar al menos una parte del permeado fuera del biorreactor 101 a través de un conducto de suministro de permeado 107. El conducto de suministro de permeado conduce el permeado libre de células al biorreactor secundario 201. En determinadas realizaciones de la invención, al menos una parte del permeado libre de células se elimina para la extracción del producto o se recicla antes de que la corriente de permeado se alimente al biorreactor secundario 201. Se proporciona una salida de sangrado de caldo 108 para alimentar directamente el caldo desde el biorreactor primario 101 al biorreactor secundario 202. En ciertas realizaciones el sangrado de caldo y el sangrado de permeado se combinan antes de alimentarse al biorreactor secundario. Puede ser deseable purificar la corriente antes de pasar al biorreactor secundario para asegurar una relación carbono:nitrógeno de al menos 10:1 o al menos 25:1 o al menos 49:1.

El biorreactor secundario 202 contiene un cultivo de una levadura oleaginosa más en un medio nutriente líquido. El biorreactor secundario recibe caldo y permea desde el biorreactor primario de manera continua o semicontinua a través de la salida de sangrado de caldo 108 y el conducto de suministro de permeado 107. El medio separador está adaptado para recibir al menos una parte de caldo del biorreactor 201 a través de un primer conducto de salida 204 y pasarlo a través del separador 205 configurado para separar sustancialmente las células del microorganismo (el retentato) del resto del caldo de fermentación (el permeado). Al menos una parte del retentato se devuelve al primer biorreactor a través de un primer conducto de retorno 206 que asegura que la densidad del cultivo del caldo se mantenga a un nivel óptimo. El separador 205 está adaptado para hacer pasar al menos una parte del permeado fuera del biorreactor 201 a través de un conducto de retirada de permeado 207. Se proporciona una salida de sangrado de caldo 208 para eliminar directamente el caldo del biorreactor secundario 201. La corriente de sangrado del caldo se trata para eliminar la biomasa para extracción de lípidos utilizando métodos conocidos. La corriente de sangrado sustancialmente libre de biomasa y las corrientes de permeado se combinan para producir una corriente combinada. En determinados aspectos de la invención, la corriente combinada puede devolverse al reactor primario para complementar el medio nutriente líquido que se añade continuamente. En ciertas realizaciones puede ser deseable procesar adicionalmente la corriente de reciclaje para retirar cualquier subproducto no deseado de la fermentación secundaria. En ciertas realizaciones, puede ajustarse el pH de la corriente de reciclaje y agregar vitaminas y metales adicionales para complementar la corriente.

En ciertas realizaciones, el CO₂ producido como subproducto del proceso de fermentación de levadura puede reciclarse al biorreactor primario para su uso como sustrato. En algunas realizaciones preferentes, la corriente de gas que sale del biorreactor secundario se trata para eliminar cualquier rastro de oxígeno antes de pasar al biorreactor primario.

65 Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Medio:

- 5 El medio a pH 6,5 se preparó utilizando el protocolo definido por Balch *et al.* (véase, por ejemplo, Balch *et al.*, (1977) International Journal of Systemic Bacteriology., 27:355-361).

Bacterias: Se obtuvieron *Acetobacterium woodii* del Centro alemán de recursos para material biológico (DSMZ). El número de acceso dado a la bacteria es DSM 1030.

10

Fermentación en el biorreactor:

Un reactor de tres litros se llenó con 1500 ml del medio. Se retiró el oxígeno del medio mediante rociado continuo con N₂. El gas se cambió de N₂ a una mezcla de 60 % de H₂, 20 % de CO₂ y 20 % de N₂ 30 minutos antes de la inoculación. El inóculo (150 ml) provino de un cultivo continuo de *Acetobacterium woodii* alimentado con la misma mezcla de gases. El biorreactor se mantuvo a 30 °C y se agitó a 200 rpm en el momento de la inoculación. Durante la siguiente fase de crecimiento del lote, la agitación se aumentó gradualmente a 600 rpm. El flujo de gas se incrementó incrementalmente en 50 ml/min según la caída de H₂/CO₂ en el espacio de cabeza como resultado del aumento de la biomasa. Para compensar el ácido acético producido, el pH se controló automáticamente a 7 usando NaOH 5 M. Durante la fermentación, se bombeó una solución 0,5 M de Na₂S al fermentador a una velocidad de 0,2 ml/hora. El cultivo se hizo continuo después de 1 día. Para alcanzar una alta biomasa junto con un alto consumo de gas, es necesario mantener la concentración de acetato en el fermentador a niveles inferiores a 20 g/l. Esto se realizó haciendo funcionar el fermentador a una velocidad de dilución relativamente alta (D~1,7/día) mientras se retenían los microbios en el fermentador con un sistema de filtración de membrana de polisulfona con un tamaño de poro de 0,1 mm (membrana de fibra hueca de GE Healthcare). El medio para el cultivo continuo fue la solución A excluyendo la solución compuesta de metal traza, que se alimentó por separado a una velocidad de 1,5 ml/hora utilizando una bomba de jeringa automatizada. El medio se desgasificó al menos 1 día antes y se desgasificó continuamente durante todo el proceso de fermentación.

Toma de muestras y procedimientos analíticos:

Se tomaron muestras de medios a intervalos durante un período de 30 días. Todas las muestras se usaron para establecer la absorbancia a 600 nm (espectrofotómetro) y el nivel de sustratos y productos (GC o HPLC). Se usó HPLC rutinariamente para cuantificar el nivel de acetato.

35

El espacio de cabeza del fermentador se analizó automáticamente mediante Gas-GC (Varian 4900 Micro-GC) cada hora.

Resultados

40

Durante un período de treinta días se produce acetato a una concentración de 12,5 g/l. La tasa de productividad de acetato promedió 21,8 g/l por día.

La concentración máxima de ácido acético en un cultivo continuo fue de 17,76 g/l (296 mM)

45

Ejemplo 2 Métodos y materiales

La levadura oleaginoso *Cryptococcus curvatus* DSM 721 se revivió en medio que contenía 10 g/l de glucosa, 1 g/l de extracto de levadura, y 1 g/l de peptona.

50

1. Los cultivos se inocularon en permeado de un proceso de *Acetobacterium woodii*. Los cultivos se fermentaron en un matraz cónico (50 ml de medio en un matraz de 250 ml) y a 25 °C y pH 7. *C. curvatus* creció en el permeado de proceso de *A. woodii* y convirtió todo el ácido acético presente en el permeado en biomasa. El pH del cultivo aumentó de 7 a 9,3 en el cultivo.

55

2. Un cultivo de *C. curvatus* se inoculó en el permeado de la fermentación de CO en CSTR de 2 l. Se añadieron vitamina B y metales. La agitación se ajustó a 300 rpm y el pH se ajustó a pH 6. Durante el análisis, el pH se ajustó a pH 7 y el cultivo mostró el mejor crecimiento a este pH, así como consumo de acetato.

60

3. Extracción de lípidos: La levadura *Cryptococcus curvatus* se cultivó en tres medios diferentes, como sigue; (i) medio que comprende 10 g/l de glucosa; (ii) medios que comprenden 15 g/l de acetato de sodio y (iii) permeado de proceso de fermentación de *a. woodii* que contenía 15 g/l de acetato. Cada tipo de medio se realizó por duplicado en matraces que contenían 250 ml de medio. Todos los matraces se incubaron a 25 °C inicialmente y luego la temperatura se aumentó a 30 °C.

Los lípidos se extrajeron de la biomasa utilizando métodos de extracción conocidos. Dado el tamaño de los matraces, estaba disponible biomasa limitada para su procesamiento. Los resultados son los siguientes: La concentración de lípidos en la biomasa del medio (i) contenía 0,325 %; la concentración de lípidos en la biomasa del medio (ii) fue 2,66

65

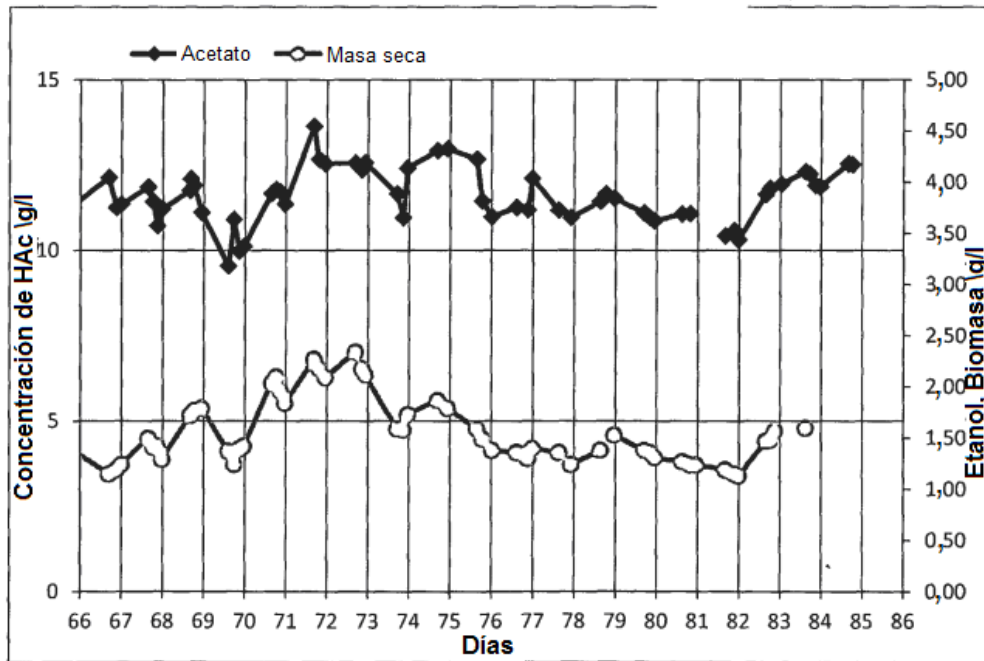
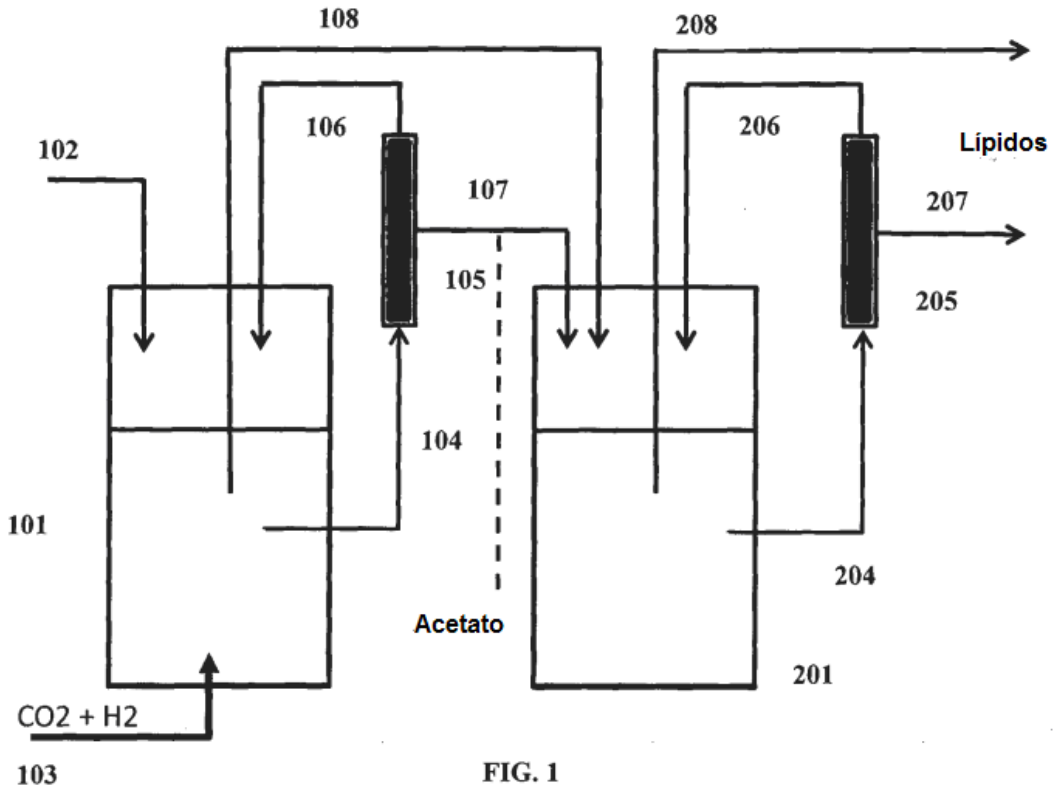
%; y la concentración de lípidos en el medio (iii) fue 4,88 %.

5 La referencia a cualquier técnica anterior en esta especificación no es, y no debería tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de indicación de que esa técnica anterior forma parte del conocimiento general común en el campo de la empresa en cualquier país.

En esta memoria descriptiva y cualquier reivindicación que sigue a continuación, a no ser que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, deben interpretarse en un sentido inclusivo a diferencia a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero sin limitación".

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir lípidos a partir de una corriente gaseosa, comprendiendo el método;
 - 5 a. hacer fluir un sustrato que comprende CO₂ y H₂ en un biorreactor primario que contiene un cultivo de *Acetobacterium woodii*;
 - b. fermentar anaeróbicamente el sustrato que comprende CO₂ y H₂ para producir acetato;
 - c. hacer fluir al menos una parte del acetato de (b) a un biorreactor secundario que contiene un cultivo de una o más levaduras; y
 - 10 d. fermentar el acetato para producir uno o más lípidos; en donde el sustrato que comprende CO₂ y H₂ es un gas residual de un proceso industrial y comprende al menos 40 % de H₂ y al menos 10 % de CO₂, y en donde el acetato se produce a una tasa de al menos aproximadamente 20 g/l/día.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el gas residual se selecciona del grupo que consiste en gas residual de una planta de hidrógeno, gas de horno de coque, gas natural, gas de reformado catalítico, gas de escape de craqueo de nafta, gas combustible de refinería, gases residuales de planta de metanol, gases residuales de planta de amoníaco, y gases de horno de cal.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 que comprende además las siguientes etapas;
 - a. separar una corriente de caldo que sale del biorreactor secundario para proporcionar una parte de biomasa y una corriente residual sustancialmente libre de biomasa;
 - b. extraer uno o más productos lipídicos de la parte de biomasa; y
 - 25 h. hacer pasar al menos una parte de la corriente residual sustancialmente libre de biomasa al reactor primario.
4. El método de la reivindicación 3 en donde la corriente residual sustancialmente libre de biomasa se hace pasar a una etapa de tratamiento antes de devolverse al biorreactor primario.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el caldo de fermentación del biorreactor secundario comprende además nitrógeno y la relación de acetato a nitrógeno es al menos 10:1.
6. El método de la reivindicación 1 en donde las una o más levaduras son una levadura oleaginoso seleccionada del grupo que comprende *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* y *Cryptococcus*.
- 35 7. El método de la reivindicación 1 en donde el pH de ambas fermentaciones se mantiene entre aproximadamente pH 6 y pH 8.
8. El método de la reivindicación 1 en donde el método es una reacción de fermentación continua o semicontinua en dos etapas.
- 40 9. El método de la reivindicación 1 en donde al menos una parte de los uno o más lípidos producidos en el segundo biorreactor se recupera y se convierte en uno o más productos terciarios seleccionados del grupo que comprende biodiesel y etanol.
- 45 10. El método de la reivindicación 1 en donde el sustrato que comprende CO₂ y H₂ comprende al menos 60 % de H₂ y al menos 20 % de CO₂.
11. El método de la reivindicación 6 en donde la levadura oleaginoso es *Cryptococcus curvatus*.



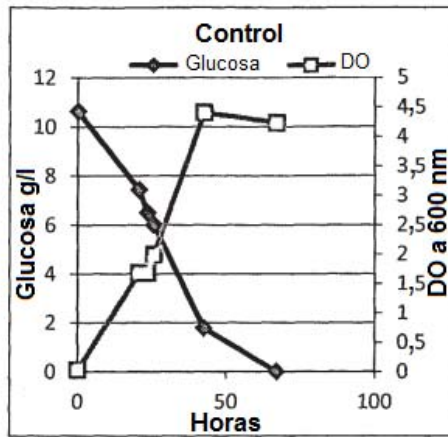


FIG. 3a

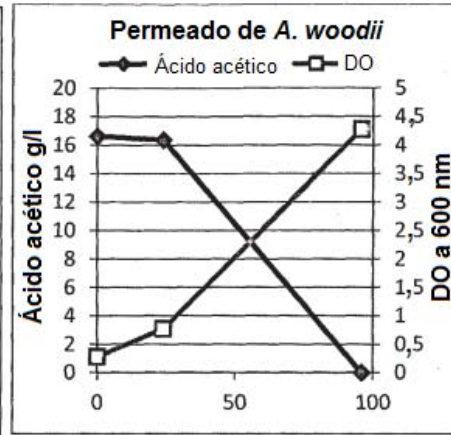


FIG. 3b