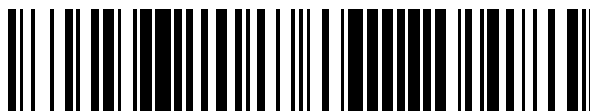


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 337**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/04** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12M 3/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2015 PCT/US2015/029563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16007216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2015 E 15818880 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3167068**

54 Título: **Control de procesos de conversión de monóxido de carbono en biorreactores**

30 Prioridad:

**11.07.2014 US 201414329881**

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

**08.07.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COLLET, CHRISTOPHE;  
WATERS, GUY WILLIAM;  
BROMLEY, JASON CARL;  
YANG, JUSTIN YI y  
WILSON, JAROD NATHAN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 841 337 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Control de procesos de conversión de monóxido de carbono en biorreactores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procesos para el inicio y la realización de la conversión de CO en un producto final, tal como etanol, en donde los datos experimentales se usan para el control del caudal del agente neutralizante básico.

10 **Descripción de la técnica relacionada**

Las preocupaciones medioambientales sobre las emisiones de gases de efecto invernadero (GHG en inglés) de combustibles fósiles han llevado a una atención cada vez mayor en las fuentes de energía renovables. Como resultado, el etanol se está convirtiendo rápidamente en un importante combustible de transporte líquido rico en hidrógeno en todo el mundo. Se espera un crecimiento continuo en el mercado mundial de la industria del etanol combustible en el futuro próximo, basado en una atención aumentada en la producción de etanol en Europa, Japón y los Estados Unidos, así como varias naciones en desarrollo. Por ejemplo, en los Estados Unidos, el etanol se usa para producir E10, una mezcla al 10 % de etanol en gasolina. En las combinaciones de E10, el componente de etanol actúa como agente oxigenante, que mejora la eficacia de la combustión y que reduce la producción de contaminantes del aire. En Brasil, el etanol satisface aproximadamente el 30 % de la demanda de combustible de transporte, tanto como agente oxigenante combinado en la gasolina como combustible puro por derecho propio. Además, la Unión Europea (UE) ha establecido objetivos, en cada uno de sus países miembro, en cuanto al consumo de combustibles de transporte sostenibles, tales como el etanol derivado de biomasa.

La gran mayoría del etanol combustible se produce a través de procesos de fermentación tradicionales basados en levaduras que usan carbohidratos derivados de cosechas, tales como la sacarosa extraída a partir de caña de azúcar o el almidón extraído a partir de cosechas de cereales, como principal fuente de carbono. Sin embargo, el coste de estas materias primas de carbohidratos está influenciado por su valor en el mercado para usos competitivos, es decir, como fuente de alimento tanto para seres humanos como para animales. Además, el cultivo de cosechas de producción de almidón o sacarosa para la producción de etanol no es económicamente sostenible en todas las geografías, ya que va en función tanto de los valores locales de la tierra como del clima. Por estas razones, resulta de particular interés el desarrollo de tecnologías para convertir recursos de carbono de menor coste y/o más abundantes en etanol combustible. En este sentido, el monóxido de carbono (CO) es un importante subproducto rico en energía de la combustión incompleta de materiales orgánicos, tales como el carbón, el aceite y los productos derivados del aceite. Los gases residuales ricos en CO son el resultado de una diversidad de procesos industriales. Por ejemplo, se indica que la industria del acero en Australia produce y libera a la atmósfera más de 500.000 toneladas métricas de CO al año.

Más recientemente, las alternativas de procesos basados en microorganismos (bacterianos) para la producción de etanol a partir de CO a escala industrial se han convertido en un objeto de interés comercial e inversión. La capacidad de crecimiento de los cultivos de microorganismos, siendo el CO la única fuente de carbono, se descubrió por primera vez en 1903. Posteriormente, se determinó que esta característica residía en el uso por parte de un organismo de la vía bioquímica de la acetil coenzima A (acetil CoA) de crecimiento autótrofo (también conocida como vía de Woods-Ljungdahl y vía de monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil CoA sintasa (CODH/ACS)). Desde entonces, se ha demostrado que una gran cantidad de organismos anaerobios, incluyendo los organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos, metaboliza el CO. Se sabe que las bacterias anaerobias, tales como aquellas del género *Clostridium*, producen etanol a partir de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, a través de la vía bioquímica de la acetil CoA. Por ejemplo, se describen diversas cepas de *Clostridium ljungdahlii* que producen etanol a partir de gases en los documentos WO 00/68407; EP 1117309 A1; US 5.173.429; US 5.593.886; US 6.368.819; WO 98/00558; y WO 02/08438. También se sabe que la bacteria *Clostridium autoethanogenum* sp produce etanol a partir de gases (Abrini y col., ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 161: 345-351 (1994)).

Debido a que cada enzima de un organismo promueve su conversión biológica designada con una selectividad esencialmente perfecta, las rutas de síntesis microbiana pueden lograr mayores rendimientos con menores costes de energía, en comparación con las rutas catalíticas convencionales. Por ejemplo, se pueden reducir los requisitos de energía para la separación de subproductos, que resultan de reacciones secundarias no selectivas, de los productos deseados. Además, se disminuyen las preocupaciones sobre el envenenamiento de los catalizadores, debido a las impurezas en el medio de reacción.

Sin embargo, a pesar de estas ventajas evidentes, la técnica debe abordar determinados retos asociados a la síntesis microbiana de etanol a partir de CO, especialmente en lo que respecta a garantizar que la tasa de producción sea competitiva con otras tecnologías. Cuando se usa CO como su fuente de carbono, las bacterias anaerobias descritas anteriormente producen etanol mediante fermentación, pero estas también producen al menos un metabolito, por ejemplo, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metano, n-butanol y/o ácido acético. La formación de cualquiera de estos metabolitos tiene el potencial de afectar significativamente en la productividad y la viabilidad económica global de un proceso dado, ya que el carbono disponible se pierde en el/los metabolito/s y la eficacia de producción del producto final deseado se ve

perjudicada. Además, a menos que un metabolito (por ejemplo, ácido acético) por sí mismo tenga valor en el momento y lugar del proceso de fermentación microbiana, este puede plantear un problema de eliminación de residuos. Se analizan diversas propuestas para abordar la formación de productos distintos del producto final deseado en la fermentación anaerobia de gases que contienen CO para producir etanol en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080 y WO2009/022925.

La tasa de producción de etanol, que es un determinante fundamental en cuanto a si un proceso de fermentación dado es económicamente atractivo, depende en gran medida de la gestión de las condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, se sabe, a partir del documento WO2010/093262, que el sustrato que contiene CO se debe proporcionar a un cultivo microbiano a una tasa que dé como resultado un crecimiento microbiano óptimo y/o la producción de metabolitos deseada. Si se proporciona un sustrato insuficiente, el crecimiento microbiano se ralentiza y los rendimientos del producto de fermentación se desplazan hacia el ácido acético a expensas del etanol. Si se proporciona un sustrato excesivo, se puede producir un crecimiento microbiano deficiente y/o una muerte celular. En el documento WO2011/002318, se halla información adicional con respecto a las relaciones entre los parámetros de operación en estos procesos.

El control de los parámetros de operación resulta particularmente importante durante el período inicial de operación, en el que los objetivos de procesamiento se centran no solo en hacer crecer el cultivo celular hasta un nivel suficiente y establecer otras condiciones para la operación continua, sino también en equilibrar las productividades del producto y el subproducto. La reducción del tiempo necesario para la realización de una operación de cultivo por lotes, antes de la operación biorreactor continua, tiene importantes implicaciones para la mejora de la economía del proceso. Esto resulta particularmente evidente en vista del hecho de que los microbios capaces de crecer en gases que contienen CO generalmente lo hacen a una tasa más lenta que los microbios usados en tecnologías competitivas con azúcares como fuente de alimento. Desde la perspectiva comercial de la operación de un proceso de fermentación, el tiempo requerido para que una población microbiana se establezca, es decir, alcance una densidad celular suficientemente alta para la síntesis de niveles de producto económicamente favorables, representa un coste de operación fundamental que afecta a la rentabilidad global. La capacidad de potenciar las tasas y/o las productividades de crecimiento del cultivo durante un período de operación inicial, por ejemplo, en condiciones de lotes y, de este modo, reducir el tiempo necesario para alcanzar las densidades celulares y/o los niveles de producto deseados, es un determinante importante para el éxito global en la comercialización de procesos biológicos para la producción de etanol a partir de gas residual que contiene CO.

### Sumario de la invención

La invención se refiere a métodos para el control del inicio y la realización de procesos de conversión de CO biológicos, basados en datos disponibles. Normalmente, al comienzo de tales procesos, el biorreactor se carga (inocula) con un medio de cultivo que contiene bacterias carboxidotróficas (es decir, que tienen la capacidad de derivar energía a partir de CO). De acuerdo con los procesos representativos, el etanol es el producto final deseado, mientras que el acetato se genera como metabolito no deseado, en forma de ácido acético. Tal como se ha analizado anteriormente, el CO se debe suministrar con criterio al biorreactor para cumplir con los objetivos competitivos. En particular, un suministro insuficiente de CO puede dar como resultado una formación excesiva de acetato a expensas del etanol, mientras que un suministro en exceso de CO puede afectar negativamente al crecimiento bacteriano. En vista de estas consideraciones, se puede usar un perfil específico del caudal a lo largo del tiempo de CO o gas que contiene CO, basado en el crecimiento bacteriano esperado durante la operación por lotes, en conjunto con información derivada a partir de otros procesos.

El objetivo de operación primordial durante un período de operación inicial (por ejemplo, un período de operación por lotes) es aumentar la concentración de bacterias (biomasa), en el medio de cultivo. Por lo tanto, el perfil de flujo de gas durante el período de operación por lotes es normalmente conservador y trata de evitar el suministro en exceso de CO. Esto puede dar como resultado la formación de ácido acético en una cantidad significativa, excediendo, en algunos casos, la del producto final de etanol deseado. Debido a que cualquier ácido acético que se genera a lo largo de los procesos de conversión bacteriana reduce el valor de pH del medio de cultivo, se puede introducir un agente neutralizante básico, tal como hidróxido de amonio acuoso. El agente neutralizante se puede dosificar al biorreactor para mantener el valor de pH (por ejemplo, un pH de 5,0) del medio de cultivo adecuado para el crecimiento bacteriano.

Las realizaciones de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones, se dirigen a procesos de fermentación biológica para la conversión del CO en un producto final deseado, tal como el etanol, que comprenden alimentar tanto un sustrato que contiene CO como un agente neutralizante básico (por ejemplo, hidróxido de amonio acuoso) a un biorreactor que comprende un medio de cultivo que contiene bacterias carboxidotróficas, en donde los datos experimentales se usan para el control del caudal del agente neutralizante básico. Los procesos generan tanto el producto final deseado como un metabolito ácido (por ejemplo, ácido acético), que se convierte mediante el agente neutralizante (por ejemplo, en una sal, tal como acetato de amonio), con el fin de evitar niveles de pH inaceptables en el medio de cultivo.

Otras realizaciones de la invención se dirigen a sistemas que comprenden un biorreactor y un controlador configurado para controlar el caudal del agente neutralizante básico al biorreactor, basados en una propiedad medida del medio

de cultivo, tal como se ha descrito anteriormente o, como alternativa, basados en un caudal medido del sustrato que contiene CO o de otro modo basados en un punto de ajuste de este sustrato. En el caso de control basado en una propiedad medida del medio de cultivo, el sistema puede comprender, además, el aparato de muestreo necesario, configurado para aislar una muestra del medio de cultivo del biorreactor para su análisis, además de un analizador configurado para analizar la muestra aislada. En cualquiera de las alternativas de método de control anteriores, los sistemas representativos pueden comprender, opcionalmente, un segundo controlador configurado para controlar el caudal del sustrato que contiene CO basado en un valor de pH medido, un aparato de muestreo configurado para aislar, del biorreactor, una muestra del medio de cultivo y/o un analizador configurado para analizar la muestra y, a continuación, introducir, en el controlador, el valor de pH medido.

Adicionalmente se desvelan, pero no forman parte del alcance de la invención, productos de programas informáticos que comprenden medios legibles por ordenador no transitorios que tienen programas informáticos incorporados en los mismos. Estos programas informáticos incluyen instrucciones para hacer que un procesador realice las etapas necesarias para llevar a cabo los procesos de control descritos en el presente documento. Estos procesos incluyen la recepción de información que se introduce en un controlador configurado para controlar un caudal de neutralización básico a un biorreactor. La información que se puede recibir e introducir, de esta manera, incluye información recibida a partir de un analizador configurado para analizar una muestra de medio de cultivo del biorreactor en cuanto a una propiedad medida, tal como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la información puede ser el caudal medido del sustrato que contiene CO, recibida a partir de un sensor de caudal o dispositivo de medición que está configurado para medir este flujo. La información recibida también puede incluir un punto de ajuste del caudal del sustrato que contiene CO. Independientemente del tipo de información que se reciba e introduzca en un controlador, los procesos representativos pueden comprender, además, la recepción de un valor de pH medido, por ejemplo, a partir de un medidor de pH u otro analizador configurado para medir el pH del medio de cultivo directamente o, de otro modo, una muestra del medio de cultivo del biorreactor. El valor de pH medido se puede introducir en un segundo controlador configurado para controlar el caudal del sustrato que contiene CO, por lo que el valor de pH medido es la base del control.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de flujo de una metodología representativa para el control de los parámetros de operación de un proceso biológico para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol.

La FIG. 2 es un gráfico de las concentraciones medidas de etanol, bacterias carboxidotróficas y ácido acético, en un medio de cultivo a lo largo del tiempo, de un proceso biológico para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol, usando una metodología de control convencional.

La FIG. 3 es un gráfico de las concentraciones medidas de etanol, bacterias carboxidotróficas y ácido acético, en un medio de cultivo a lo largo del tiempo, de un proceso biológico para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol, usando una metodología de control, tal como se describe en el presente documento.

La FIG. 4 es un gráfico comparativo del caudal del sustrato que contiene CO a lo largo del tiempo, de procesos biológicos para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol, usando una metodología de control convencional y una metodología de control tal como se describe en el presente documento.

La FIG. 5 es un gráfico comparativo de la concentración de las bacterias carboxidotróficas en un medio de cultivo a lo largo del tiempo, de procesos biológicos para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol, usando una metodología de control convencional y una metodología de control tal como se describe en el presente documento.

La FIG. 6 es un gráfico de las concentraciones medidas de etanol, bacterias carboxidotróficas y ácido acético, en un medio de cultivo a lo largo del tiempo, así como el caudal medido de medio de cultivo nuevo, de un proceso biológico para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol, usando una metodología de control representativa, tal como se describe en el presente documento.

La FIG. 7 es un gráfico de las concentraciones medidas de etanol, bacterias carboxidotróficas y ácido acético, en un medio de cultivo a lo largo del tiempo, así como los caudales medidos de una solución de agente neutralizante de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y un sustrato que contiene CO, de un proceso biológico para la conversión de un sustrato que contiene CO en etanol, usando una metodología de control alternativa, tal como se describe en el presente documento.

#### Descripción detallada

La presente invención se refiere a procesos para la producción de un producto final deseado, tal como etanol, mediante la alimentación de CO en un sustrato que contiene CO a un biorreactor que comprende un medio de cultivo que contiene bacterias carboxidotróficas, en donde los datos experimentales se usan para el control del caudal del agente neutralizante básico. Además del producto final deseado, los procesos representativos generan adicionalmente metabolitos no deseados o menos deseados. Un ejemplo de un metabolito ácido que se puede generar además de un producto deseado, tal como etanol, es el acetato (por ejemplo, en forma de ácido acético). Las bacterias carboxidotróficas o los microbios representativos (es decir, los microorganismos que obtienen energía y carbono a partir de CO) son aquellos del género *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina* y *Desulfotomaculum*. Los ejemplos particulares de bacterias que son *Clostridia* incluyen *C. ljundahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* y *C. beijerinckei*.

Los sustratos que contienen CO representativos incluyen ampliamente cualquier gas, o posiblemente líquido, que contenga CO, en el que el monóxido de carbono se puede poner a disposición de una o más cepas de bacterias para su crecimiento y/o fermentación. Tales sustratos que contienen CO preferentemente no incluyen contaminantes en la medida en que tales contaminantes puedan tener un efecto adverso sobre el crecimiento de las bacterias carboxidotróficas (por ejemplo, uno o más contaminantes no están presentes en tales concentraciones o cantidades que la tasa de crecimiento se reduzca en más del 10 % en un determinado conjunto de condiciones, en comparación con la tasa de crecimiento en las mismas condiciones, pero sin el/los contaminante/s). Los sustratos que contienen CO gaseoso representativos contienen, típicamente, una proporción significativa de CO, preferentemente, al menos del 5 % al 100 % de CO en volumen. Tales sustratos se producen a menudo como productos residuales de procesos industriales, tales como procesos de fabricación de acero o procesos de fabricación de productos no ferrosos. Otros procesos en los que se generan sustratos que contienen CO gaseoso incluyen la gasificación de materia orgánica, tal como metano, etano, propano, carbón, gas natural, aceite crudo, residuos de bajo valor de la refinería de aceite (incluyendo el coque de petróleo o petcoque), residuos sólidos municipales o biomasa. La biomasa incluye subproductos obtenidos durante la extracción y procesamiento de productos alimenticios, tales como azúcar a partir de caña de azúcar, o almidón a partir de maíz o granos, o residuos no alimenticios de biomasa generados mediante la industria forestal. Cualquiera de estos materiales carbonosos se puede gasificar, es decir, quemarse parcialmente con oxígeno, para producir gas de síntesis (gas sintético que comprende cantidades significativas de H<sub>2</sub> y CO). Ventajosamente, las corrientes de gas de estos procesos se pueden usar tal como se describe en el presente documento para la producción beneficiosa de productos finales útiles, tales como etanol. En otras realizaciones, el sustrato que comprende CO se puede derivar a partir del reformado de hidrocarburos con vapor. Estos procesos se describen con más detalle en las publicaciones de solicitud de Estados Unidos n.º US2013/0045517A1; US2013/0210096A1; US2013/0203143A1 y US2013/0316411A1 y la patente de Estados Unidos n.º US 8.383.376.

Aunque no resulta necesario que el sustrato que contiene CO contenga ningún hidrógeno, la presencia de H<sub>2</sub> normalmente no es perjudicial para la formación del producto final deseado. En realizaciones particulares, el sustrato que contiene CO puede comprender concentraciones bajas de H<sub>2</sub>, por ejemplo, de menos del 10 % en volumen, de menos del 5 % en volumen o de menos del 1 % en volumen. El sustrato que contiene CO también puede contener algo de CO<sub>2</sub>, por ejemplo, del 1 % al 80 % en volumen, del 1 % al 50 % en volumen y del 1 % al 30 % en volumen. Cualquier sustrato que contenga CO, tal como un sustrato que contenga CO gaseoso, se puede someter a tratamiento para retirar cualquier impureza no deseada, tal como partículas de polvo fino o cualquier otro contaminante sólido, líquido o gaseoso que pueda ser perjudicial para las bacterias carboxidotróficas o el proceso de conversión biológica en general, antes de su uso en el proceso de conversión biológica. Por ejemplo, el sustrato que contiene CO gaseoso se puede filtrar o lavar usando métodos conocidos.

En el contexto de un metabolito ácido que es el ácido acético, los términos "ácido acético" o "acetato" se refieren al acetato total presente en el medio de cultivo, ya sea en su forma aniónica (disociada) (es decir, como ion de acetato o CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) o en forma de ácido acético molecular libre (CH<sub>3</sub>COOH), dependiendo la relación de estas formas del pH del sistema. El término "biorreactor" incluye cualquier recipiente adecuado para la contención de un cultivo de bacterias carboxidotróficas que se pueda usar para llevar a cabo los procesos biológicos descritos en el presente documento, que también se pueden denominar procesos de fermentación, en la medida en que estos generalmente se realicen de manera anaerobia. Un biorreactor adecuado puede ser un reactor de tanque agitado continuo (CSTR en inglés), un reactor de células inmovilizadas (ICR en inglés), un reactor de lecho percolador (TBR en inglés), un reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR en inglés), una columna de burbujas, un fermentador de elevación de gas, un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR en inglés), un mezclador estático o puede incluir otros recipientes o dispositivos (por ejemplo, torres o disposiciones de tuberías) adecuados para la puesta en contacto del sustrato que contiene CO con el medio de cultivo bacteriano (por ejemplo, con cinética de disolución y transporte de masa favorable para llevar a cabo la conversión biológica).

Otras corrientes de proceso, parámetros de operación y equipos adecuados para su uso en los procesos biológicos descritos en el presente documento se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2011/0212433.

La presente invención se asocia, más particularmente, al descubrimiento de procesos biológicos para la conversión de CO en productos finales valiosos, tales como etanol, en los que (i) el tiempo requerido para un período de operación por lotes u otro período de operación inicial, antes de lograr una operación continua, que se puede delimitar mediante la adición de medio de cultivo nuevo a un caudal definido o mediante otra diana de inicio del proceso, se reduce inesperadamente y/o (ii) la productividad del producto final deseado u otro parámetro de rendimiento del proceso (por ejemplo, la tasa de crecimiento bacteriano) se mejora inesperadamente durante este período de operación por lotes u otro período de operación inicial. La conversión de la operación por lotes en la operación continua se puede delimitar mediante el comienzo de la adición de medio de cultivo nuevo al biorreactor usado en el proceso. Como alternativa, si la tasa de adición de medio de cultivo nuevo se aumenta gradualmente en lugar de comenzar en un punto temporal específico, la conversión de la operación por lotes en la operación continua se puede delimitar mediante el logro de una tasa de adición de medio de cultivo nuevo diana y/o el logro de una tasa de extracción de medio de cultivo que contenga bacterias diana del biorreactor. Las tasas de adición de medio de cultivo nuevo y/o extracción de medio de cultivo que contiene bacterias diana pueden ser las tasas asociadas a una operación en estado estable, es decir, una operación en la que las condiciones se mantengan sustancialmente constantes durante un período prolongado (por

ejemplo, al menos 3 días o al menos 10 días) de producción de un producto final deseado. De otro modo, estas tasas diana pueden ser al menos el 60 %, al menos el 75 % o al menos el 90 % de las tasas asociadas a la operación en estado estable.

- 5 Aparte de una tasa de medio de cultivo nuevo diana, otras dianas de inicio del proceso que se pueden usar para delimitar un período de operación inicial de un período de operación en estado estable o "en marcha" pueden incluir una concentración de medio de cultivo del producto deseado (por ejemplo, etanol), bacterias carboxidotróficas o metabolito ácido. Las dianas de inicio del proceso también pueden incluir la productividad del producto deseado, bacterias carboxidotróficas o metabolito ácido. Las dianas de inicio del proceso pueden ser predeterminadas, es decir, establecidas a partir del principio del proceso y, posiblemente, usadas como datos de entrada para los sistemas de control, incluyendo los productos de programas informáticos (soporte lógico), usadas para la supervisión y/o el control de los procesos biológicos, incluyendo la supervisión y/o el control de la adición de medio de cultivo nuevo.

- 15 La invención se basa en el hallazgo de que determinadas metodologías de control, que se pueden automatizar, pueden hacer coincidir eficazmente el caudal del sustrato que contiene CO con una propiedad medida del medio de cultivo. Estas metodologías, cuando se usan en un período de operación inicial (por ejemplo, un período de operación por lotes) o cuando se usan en general, proporcionan ventajosamente un equilibrio significativamente mejorado en lo que respecta a la reducción en la producción de ácido acético o acetato, junto con la evitación del suministro en exceso de CO. Sorprendentemente, los objetivos del período de operación por lotes u otro período de operación inicial se pueden lograr mucho antes y también de manera mucho más eficaz en lo que respecta a las productividades tanto del producto final deseado como del/de los metabolito/s no deseado/s, en comparación con la práctica convencional de establecer un perfil de caudal de gas que contiene CO desde el principio. De acuerdo con algunas realizaciones, la economía del proceso global se puede mejorar en gran medida como resultado del período de puesta en marcha reducido para el logro de una concentración de bacterias en el medio de cultivo que permita la transición a una operación continua. Por ejemplo, el tiempo desde la inoculación del biorreactor hasta que se logra una concentración de bacterias de biomasa dada se puede reducir en al menos el 20 % (por ejemplo, del 20 % al 80 %), típicamente en al menos el 35 % (por ejemplo, del 35 % al 75 %) y a menudo en al menos el 50 % (por ejemplo, del 50 % al 70 %), en comparación con los resultados logrados usando prácticas convencionales para el control de los parámetros del proceso.

- 30 De acuerdo con una metodología de control particular, tal como se definen en las reivindicaciones, una propiedad del medio de cultivo, medida durante un período de operación inicial (por ejemplo, un período de operación por lotes) o durante algún otro período de operación (por ejemplo, un período de operación continua, en estado estable o normal), se usa como base para el control del caudal de un agente neutralizante básico (por ejemplo, hidróxido de amonio acuoso). Las propiedades representativas incluyen la concentración de un metabolito ácido (por ejemplo, ácido acético o acetato), la productividad de un metabolito ácido, la concentración de las bacterias carboxidotróficas, la productividad de las bacterias carboxidotróficas o una combinación de tales propiedades. En general, un aumento en cualquiera de estas propiedades conducirá direccionalmente a un aumento en el caudal del agente neutralizante básico. En una realización específica, el caudal del agente neutralizante básico se controla basándose en una concentración del metabolito ácido diana en el medio de cultivo, que a su vez se determina a partir de una concentración medida de las bacterias carboxidotróficas. De esta manera, la metodología de control tiene en cuenta el consumo del agente neutralizante básico y, específicamente, el aumento de la utilización de nitrógeno, en el cultivo bacteriano en crecimiento. Esto proporciona ventajosamente condiciones durante la puesta en marcha (por ejemplo, un período de operación por lotes) que se adaptan específicamente a los objetivos de hacer crecer rápidamente el cultivo bacteriano con una distribución de rendimiento del producto favorable.

- 45 La propiedad del medio de cultivo celular se puede medir de manera continua o intermitente, por ejemplo, de manera periódica, siendo el período de tiempo entre cada medición sucesiva generalmente de cada 0,1 segundos a cada 120 segundos, típicamente de cada 0,5 segundos a cada 60 segundos y, a menudo, de cada segundo a cada 10 segundos. La propiedad medida se puede obtener mediante el análisis en línea de la concentración, en el medio de cultivo, de ya sean las bacterias carboxidotróficas o del metabolito ácido. Basándose en sucesivas mediciones de concentración (por ejemplo, en gramos por litro, g/l), junto con el intervalo de tiempo entre las sucesivas mediciones, se pueden calcular las productividades (por ejemplo, en gramos por litro al día, g/l-día<sup>-1</sup>) de las bacterias carboxidotróficas o del metabolito ácido. Por ejemplo, si la concentración de las bacterias carboxidotróficas se determina a intervalos sucesivos, el Tiempo 1 y Tiempo 2 designados, entonces la productividad de las bacterias carboxidotróficas en el Tiempo 2 se puede expresar de la siguiente manera: (concentración en el Tiempo 2 - concentración en el Tiempo 1) / (Tiempo 2 - Tiempo 1).

- En general, la concentración del metabolito ácido se mide en una muestra de medio de cultivo que está libre o sustancialmente libre de las bacterias carboxidotróficas, como resultado de la filtración o separación de membrana. Por ejemplo, se puede incorporar un filtro que tenga un tamaño de poro adecuado (por ejemplo, en el intervalo de 0,05 µm a 1 µm) para la retirada de las bacterias en una línea de muestra de un sistema de muestreo configurado para extraer medio de cultivo libre de células de un reactor individual o de otro modo configurado para extraer tal líquido de múltiples reactores (por ejemplo, de 2 a 10 reactores, tal como de 4 a 6 reactores, que pueden operar en serie o en paralelo o de otro modo operar independientemente) en diferentes tiempos, con el fin de supervisar de manera automática y por separado el rendimiento de los reactores. Por ejemplo, una muestra libre de células del medio de cultivo puede estar disponible como corriente de permeado a partir de un sistema de separación de

membrana, en el que la corriente de retención rica en células se recicla al biorreactor. El permeado, si no se usa para el análisis, normalmente puede fluir a un segundo biorreactor (por ejemplo, operando en serie). El filtrado o permeado libre de células obtenido a partir del biorreactor puede proporcionar muestras representativas usadas para la medición en línea de las propiedades de la concentración del producto final (por ejemplo, etanol) o la concentración del metabolito ácido (por ejemplo, ácido acético o acetato). Estas concentraciones se pueden determinar mediante métodos analíticos conocidos, tales como cromatografía (por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión o HPLC en inglés).

En el caso de la concentración de bacterias carboxidotróficas como propiedad medida, el medio de cultivo se puede extraer directamente del biorreactor, por ejemplo, como corriente de purga que normalmente puede fluir a un segundo biorreactor (por ejemplo, operando en serie) si no se usa para el análisis. Una línea de muestra de una corriente de purga u otra corriente para la extracción del medio de cultivo celular se puede conectar de manera fluida a un dispositivo analítico adecuado para la medición en línea de la propiedad de la concentración de las bacterias carboxidotróficas. Los dispositivos representativos incluyen aquellos que miden la absorbancia o la transmisión de energía electromagnética a través de la muestra (por ejemplo, un espectrofotómetro), una determinada actividad biológica de la muestra (por ejemplo, un lector de placas) u otra propiedad de la muestra (por ejemplo, impedancia/capacitancia) en una sonda desechable o reutilizable (por ejemplo, una sonda de biomasa en línea). La línea de muestra de una corriente de purga u otra corriente puede ser parte de un sistema de muestreo configurado para extraer medio de cultivo de un reactor individual o de otro modo configurado para extraer tal líquido de múltiples reactores (por ejemplo, de 2 a 10 reactores, tal como de 4 a 6 reactores, que pueden operar en serie o en paralelo o de otro modo operar independientemente) en diferentes tiempos, con el fin de supervisar de manera automática y por separado el rendimiento de los reactores.

Los sistemas de muestreo para el análisis en línea de los medios de cultivo de uno o múltiples biorreactores incluirán conductos adecuados (por ejemplo, tubos o tuberías), válvulas, bombas y accionadores para permitir el muestreo automatizado de un reactor deseado en el tiempo deseado y dispositivos adecuados para el lavado (la purga) de líneas de muestra para obtener resultados precisos. En el caso de analizar el medio de cultivo libre de células, por ejemplo, para obtener la concentración del etanol o acetato, el líquido filtrado o permeado de membrana, tal como se ha descrito anteriormente, se puede alimentar (por ejemplo, bombear usando una bomba peristáltica) al menos de manera intermitente, pero preferentemente de manera continua, a través de un recipiente de muestra adecuado que está configurado para el análisis en línea. Por ejemplo, las líneas de entrada y salida en comunicación fluida con tal recipiente de muestra (por ejemplo, un vial de muestra) puede conducir continuamente una corriente filtrada de medio de cultivo hacia y desde el recipiente de muestra. La alimentación continua de medio de cultivo a través de un recipiente de muestra, de acuerdo con algunas realizaciones, implicará hacer fluir una corriente de filtrado o permeado libre de células, tal como se ha descrito anteriormente, durante la entrada del recipiente de muestra, a través del recipiente de muestra y a la salida del recipiente de muestra durante algún período de operación del biorreactor, por ejemplo, durante al menos 3 minutos, al menos 5 minutos o al menos 10 minutos. Por ejemplo, el medio de cultivo libre de células filtrado se puede alimentar de manera continua a través del recipiente de muestra durante 9 minutos, seguido del retrolavado de 1 minuto de un filtro en la línea de muestra, con el fin de evitar la obstrucción del filtro. El exceso de medio de cultivo que no se muestrea y que fluye a través de la salida del recipiente de muestra se puede desechar como residuo.

De esta manera, el líquido presente en el recipiente de muestra es representativo del medio de cultivo que contiene células en el biorreactor, en lo que respecta a las concentraciones del producto final deseado (por ejemplo, etanol) y los metabolitos (por ejemplo, ácido acético o acetato) en este medio de cultivo que contiene células en el momento del análisis del medio de cultivo libre de células en la recipiente de muestra. Las longitudes de las líneas de muestra se pueden minimizar para minimizar cualquier desnivel entre la/s concentración/es real/es del producto final y/o el/los metabolito/s en el biorreactor y la/s concentración/es medida/s del medio de cultivo libre de células en el recipiente de muestra en el momento del análisis. De acuerdo con algunas realizaciones, el desnivel entre la concentración real y medida del producto final y/o un metabolito será menor del 10 %, menor del 5 % o menor del 2 %. Por lo tanto, una muestra del medio de cultivo libre de células se puede extraer del recipiente de muestra y analizar, con el fin de determinar la/s concentración/es del producto final y el/los metabolito/s en el biorreactor esencialmente en tiempo real. Por ejemplo, el muestreo automatizado puede implicar el uso de una aguja de muestreo para perforar un sello de caucho sobre la parte superior del recipiente de muestra y la extracción de una muestra de medio de cultivo libre de células a intervalos regulares, con un período de tiempo entre las sucesivas mediciones tal como se ha descrito anteriormente. Un aparato de muestreo automatizado puede incluir, por ejemplo, de 2 a 10 recipientes de muestra, tal como 4 a 6 recipientes de muestra, para el muestreo de medios de cultivo del mismo número de biorreactores, que pueden operar en serie o en paralelo o de otro modo operar de manera independiente.

Más en general, se pueden configurar aparatos de muestreo automatizados, usando conductos adecuados (por ejemplo, tubos o tuberías), válvulas, bombas y accionadores, para el análisis tanto del medio de cultivo celular como del medio de cultivo libre de células, tal como se ha descrito anteriormente, de múltiples reactores (por ejemplo, de 2 a 10 reactores, tal como de 4 a 6 reactores, que pueden operar en serie o en paralelo o de otro modo operar independientemente) en diferentes tiempos, con el fin de supervisar de manera automática y por separado el rendimiento de los reactores. Las propiedades del medio de cultivo, incluyendo la concentración y productividad del/de los metabolito/s (por ejemplo, ácido acético o acetato) y/o la concentración y productividad de las bacterias

carboxidotróficas, se pueden determinar automáticamente a intervalos regulares, con un período de tiempo entre las sucesivas mediciones tal como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el uso del muestreo y el análisis automatizados en línea permite que se introduzcan los resultados analíticos directamente en el controlador relevante (por ejemplo, para el control del caudal del agente neutralizante básico), sin intervención humana. Además, los aparatos de muestreo automatizados tal como se describen en el presente documento permiten la supervisión de las propiedades de un medio de cultivo de biorreactor o medios de cultivo de múltiples biorreactores, sobre una base esencialmente en tiempo real, sin la necesidad de que los operadores supervisen y manipulen, por ejemplo, mediante la realización de diluciones y/o el pipeteado, múltiples muestras líquidas de múltiples biorreactores. De este modo, se mejora significativamente la fiabilidad y la reproducibilidad de los datos, así como la operación global del/de los biorreactor/es.

Preferentemente, las metodologías de control tal como se describen en el presente documento están automatizadas, lo que implica el uso de un programa informático con instrucciones adecuadas para hacer que un procesador transmita las señales necesarias a los controladores para llevar a cabo estas metodologías de control. De acuerdo con una metodología de control particular, una propiedad medida del medio de cultivo se usa como base para el control del caudal del agente neutralizante básico (por ejemplo, un compuesto de hidróxido, tal como hidróxido de amonio acuoso u otra base orgánica o inorgánica). Tal metodología de control, en comparación con las metodologías de control convencionales, puede reducir ventajosamente el tiempo de un período de operación inicial (por ejemplo, un período de operación por lotes), por ejemplo, antes de un período de operación continua o en estado estable, que puede estar delimitado por una tasa definida de extracción de un producto final deseado (por ejemplo, etanol) u otro parámetro de operación definido. Sin quedar limitados a la teoría, la reducción en el tiempo se puede atribuir, al menos en parte, al hecho de que las bacterias carboxidotróficas utilizan o consumen el agente neutralizante básico (por ejemplo, utilizan nitrógeno en el agente neutralizante básico). En general, por lo tanto, las metodologías de control tal como se describen en el presente documento resultan particularmente ventajosas en los procesos de biorreactor en los que al menos dos corrientes de alimentación (por ejemplo, un sustrato que contiene CO y un agente neutralizante básico) al medio de cultivo se consumen, metabolizan o de otro modo utilizan por parte de las bacterias contenidas en las mismas. En otras realizaciones, las metodologías de control descritas en el presente documento se pueden usar tanto en un período de operación por lotes como en un período de operación continua o únicamente en un período de operación continua.

Las propiedades representativas incluyen una concentración medida (es decir, en unidades de masa/volumen, tales como gramos/litro o  $\text{gramos} \cdot \text{litro}^{-1}$ ) o una productividad medida (es decir, en unidades de masa/(volumen  $\cdot$  tiempo), tales como  $\text{gramos}/(\text{litro} \cdot \text{día})$  o  $\text{gramos} \cdot \text{litro}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) del metabolito ácido (por ejemplo, ácido acético o acetato) o de las bacterias carboxidotróficas. De acuerdo con realizaciones preferidas, la propiedad medida es una concentración medida o productividad medida del metabolito ácido. Cualquiera de las propiedades anteriores se puede medir de manera continua o intermitente (por ejemplo, de manera periódica) durante un período de operación inicial (por ejemplo, un período de operación por lotes) u otro período, con una frecuencia de medición y usando técnicas de muestreo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una muestra de una corriente de permeado que está libre de células o al menos sustancialmente libre de células, se puede analizar para determinar su concentración del metabolito ácido usando HPLC.

El control del caudal del agente neutralizante básico se basa en una diferencia entre las propiedades medidas del medio de cultivo, tal como se define en las reivindicaciones, y sus correspondientes puntos de ajuste. Por ejemplo, si la concentración medida de un metabolito ácido es la base para el control, entonces el caudal del agente neutralizante básico se puede controlar basándose en la diferencia entre la concentración medida del metabolito ácido y la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido en el medio de cultivo. Del mismo modo, si una productividad medida del metabolito ácido, una concentración medida de las bacterias carboxidotróficas o una productividad medida de las bacterias carboxidotróficas es la base para el control, entonces el caudal del agente neutralizante básico se puede controlar basándose en la diferencia entre (i) la productividad medida del metabolito ácido y la productividad de punto de ajuste del metabolito ácido, (ii) la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas y la concentración de punto de ajuste de las bacterias carboxidotróficas o (iii) la productividad medida de las bacterias carboxidotróficas y la productividad de punto de ajuste de las bacterias carboxidotróficas.

En caso de que se determine una concentración de punto de ajuste del metabolito ácido, por ejemplo, si la concentración medida del metabolito ácido excede esta concentración de punto de ajuste (o diana), la metodología de control puede dar como resultado una disminución direccional del caudal del agente neutralizante básico. Esto finalmente disminuirá la concentración del metabolito ácido en el medio de cultivo, ya que el caudal disminuido del agente neutralizante básico hará que disminuya el pH del medio de cultivo. De acuerdo con realizaciones preferidas, el caudal del sustrato que contiene CO se puede controlar basándose en un valor de pH medido (por ejemplo, obtenido usando un medidor de pH en línea) del medio de cultivo. Por lo tanto, una disminución en el valor de pH medido (por ejemplo, hasta por debajo de un punto de ajuste o una diana de valor de pH, tal como 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 o 6,0) puede causar un aumento en el caudal del sustrato que contiene CO. Cuando al medio de cultivo se le suministra un flujo del sustrato que contiene CO aumentado, la productividad del metabolito ácido disminuye a favor de la productividad del etanol, lo que hace que la concentración del metabolito ácido disminuya, por ejemplo, direccionalmente hacia la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido y el valor de pH aumente. Por el contrario, si la concentración medida del metabolito ácido se encuentra por debajo de la concentración de punto de ajuste (o diana) determinado,



la metodología de control puede dar como resultado un aumento direccional del caudal del agente neutralizante básico. Esto finalmente aumentará la concentración del metabolito ácido en el medio de cultivo, ya que el caudal aumentado del agente neutralizante básico hará que aumente el pH del medio de cultivo. El caudal del sustrato que contiene CO se puede controlar basándose en un valor de pH medido (por ejemplo, obtenido usando un medidor de pH en línea) del medio de cultivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, un aumento en el valor de pH medido (por ejemplo, hasta por encima de un punto de ajuste o una diana de valor de pH, tal como 4,2, 4,7, 5,2, 5,7 o 6,2) pueden causar una disminución en el caudal del sustrato que contiene CO. Cuando al medio de cultivo se le suministra un flujo del sustrato que contiene CO disminuido, la productividad del metabolito ácido aumenta a expensas de la productividad del etanol, lo que hace que la concentración del metabolito ácido aumente, por ejemplo, direccionalmente hacia la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido y el valor de pH disminuya.

Resultan posibles metodologías de control análogas, mediante el control del flujo del agente neutralizante básico de acuerdo con otras propiedades medidas del medio de cultivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, (i) si la productividad medida del metabolito ácido excede una productividad de punto de ajuste (o diana) correspondiente, la metodología de control puede dar como resultado una disminución direccional del caudal del agente neutralizante básico, (ii) si la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas excede una concentración de punto de ajuste (o diana) correspondiente, la metodología de control puede dar como resultado un aumento direccional del caudal del agente neutralizante básico o (iii) si la productividad medida de las bacterias carboxidotróficas excede una concentración de punto de ajuste (o diana) correspondiente, la metodología de control puede dar como resultado un aumento direccional del caudal del agente neutralizante básico. La FIG. 1 representa una metodología de control representativa en la que el caudal del agente neutralizante básico, hidróxido de amonio acuoso ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), se basa en la productividad medida del metabolito ácido, ácido acético. El caudal de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a su vez, afecta al pH del medio de cultivo. Si la respuesta a cualquier cambio en el caudal de  $\text{NH}_4\text{OH}$  es el mantenimiento del pH del medio de cultivo (es decir, el pH es "uniforme"), entonces el caudal del sustrato que contiene CO permanece sin cambios. Sin embargo, si tal respuesta aumenta el pH del medio de cultivo por encima de su punto de ajuste (es decir, el pH es "alto"), entonces se disminuye el flujo del sustrato que contiene CO, aumentando la productividad del ácido acético y devolviendo el pH a su punto de ajuste. Si tal respuesta disminuye el pH del medio de cultivo por debajo de su punto de ajuste (es decir, el pH es "bajo"), entonces se aumenta el flujo del sustrato que contiene CO, disminuyendo la productividad del ácido acético y devolviendo el pH a su punto de ajuste.

Cualquiera de los puntos de ajuste de las propiedades del medio de cultivo (por ejemplo, la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido, la productividad de punto de ajuste del metabolito ácido, la concentración de punto de ajuste de las bacterias carboxidotróficas o la productividad de punto de ajuste de las bacterias carboxidotróficas) se puede determinar, a su vez, basándose en uno o más de otros parámetros de operación medidos (por ejemplo, los caudales, las concentraciones y/o las productividades o el pH medidos) del proceso del biorreactor. Por ejemplo, la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas o la productividad medida de las bacterias carboxidotróficas se puede usar para determinar un punto de ajuste. De acuerdo con una realización específica y basándose en determinados descubrimientos relacionados con la presente invención, el punto de ajuste puede ser proporcional a la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas o la productividad medida de las bacterias carboxidotróficas. La concentración de punto de ajuste del metabolito ácido se determina mediante la Fórmula

$$A_1 \cdot \text{BIOCON}_{mv} + B_1$$

en donde  $A_1$  representa una constante de proporcionalidad entre el punto de ajuste y la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas ( $\text{BIOCON}_{mv}$ ) y  $B_1$  representa un desnivel. Las constantes  $A_1$  y  $B_1$  se determinan empíricamente a partir de datos experimentales, por ejemplo, datos anteriores obtenidos usando el mismo biorreactor o de otro modo obtenidos usando un biorreactor que contiene un cultivo microbiano para llevar a cabo el mismo proceso de conversión (por ejemplo, la conversión de CO en etanol). Más específicamente, estas constantes se pueden obtener mediante la realización de un análisis de regresión lineal de tales datos anteriores. En el caso de determinar la  $\text{BIOCON}_{mv}$ , el muestreo y análisis para determinar la concentración de las bacterias carboxidotróficas se pueden realizar tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización de ejemplo, por lo tanto, una concentración medida de las bacterias carboxidotróficas ( $\text{BIOCON}_{mv}$ ) se puede obtener usando una sonda de biomasa en línea u otro dispositivo de muestreo y analizador de muestras. A partir del valor de la  $\text{BIOCON}_{mv}$ , se determina la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido (o concentración diana) o la productividad de punto de ajuste del metabolito ácido (o productividad diana), por ejemplo, de acuerdo con la Fórmula dada anteriormente.

Generalmente, se añade al biorreactor un diluyente como medio de cultivo nuevo, si no inicialmente, a continuación, en algún punto temporal posterior durante el proceso de conversión biológica. El diluyente se puede introducir por primera vez, es decir, comenzar el flujo de diluyente, al mismo tiempo que se introducen, en primer lugar, una o más alimentaciones al biorreactor (por ejemplo, el sustrato que contiene CO y/o el agente neutralizante básico). De otro modo, el diluyente se puede introducir por primera vez algún tiempo después (por ejemplo, al menos 2 horas después, al menos 6 horas después o al menos 12 horas después), una o más otras alimentaciones al biorreactor (por ejemplo, el sustrato que contiene CO y/o el agente neutralizante básico) se introducen por primera vez. El flujo de medio de cultivo nuevo puede comenzar después de alcanzar una diana de comienzo de medio de cultivo adecuada, que puede

ser la misma que cualquiera de las dianas de inicio del proceso descritas anteriormente. Tal diana puede incluir, por ejemplo, una concentración o productividad predeterminada de ya sean las bacterias carboxidotróficas o el metabolito ácido. En general, la adición de un diluyente, tal como medio de cultivo nuevo, a un determinado caudal en masa o caudal volumétrico va acompañada (por ejemplo, simultáneamente) de la extracción del medio de cultivo, incluyendo el producto final deseado y cualquier metabolito, a un caudal en masa o caudal volumétrico comparable. El medio de cultivo extraído puede (i) estar libre o sustancialmente libre de las bacterias carboxidotróficas (por ejemplo, en el caso de la separación por filtración o separación por membrana) o (ii) contener bacterias carboxidotróficas en la misma o sustancialmente la misma concentración que en el medio de cultivo contenido en el biorreactor (por ejemplo, en el caso de la extracción sin separación). En algunos casos, el medio de cultivo extraído puede incluir partes (por ejemplo, corrientes separadas) tanto de (i) como de (ii). En cualquier caso, uno o ambos de (i) y (ii) se pueden alimentar a un segundo biorreactor para llevar a cabo el mismo proceso de conversión biológica de CO a etanol (por ejemplo, operando en serie con el primer biorreactor).

Preferentemente, el caudal del diluyente se aumenta gradualmente durante la totalidad o parte de un período de operación por lotes, tal como se define en el presente documento. Sin embargo, no se requiere que se añada ningún flujo de diluyente durante este período, de tal manera que el flujo de diluyente se añada únicamente durante un período de operación posterior (por ejemplo, continuo) o de tal manera que la introducción de diluyente en el biorreactor se use para delimitar la transición de un período de operación por lotes a un período de operación continua.

Al igual que con el caudal del agente neutralizante básico, el caudal de diluyente se puede controlar basándose en cualquiera de las propiedades medidas del medio de cultivo y usando cualquiera de las metodologías de control, tal como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con realizaciones particulares, el caudal de diluyente al biorreactor se controla basándose en la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas o la productividad medida de las bacterias carboxidotróficas en el medio de cultivo. Basándose en determinados descubrimientos relacionados con la presente invención, un punto de ajuste del caudal de diluyente se puede determinar de acuerdo con una función exponencial, siendo la concentración medida o la productividad medida el exponente. Por ejemplo, el punto de ajuste del caudal de diluyente se puede determinar de acuerdo con una de las Fórmulas

$C_1^{(BIOCONmv)}$

en donde  $BIOCONmv$  representa la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas y  $C_1$  es una constante. La constante  $C_1$  se determina empíricamente a partir de datos experimentales, por ejemplo, a partir de datos anteriores obtenidos usando el mismo biorreactor o de otro modo obtenidos usando un biorreactor que contiene un cultivo microbiano para llevar a cabo el mismo proceso de conversión (por ejemplo, la conversión de CO en etanol). En el caso de determinar la  $BIOCONmv$ , el muestreo y análisis para determinar la concentración de las bacterias carboxidotróficas se pueden realizar tal como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con realizaciones particulares, tal como se define en la reivindicación 3, por lo tanto, durante un período de operación por lotes u otro período de operación, de alimentar tanto el sustrato que contiene CO como el agente neutralizante básico al biorreactor, el caudal del agente neutralizante básico se controla basándose en el caudal del sustrato que contiene CO. Por ejemplo, el caudal del agente neutralizante básico se puede controlar basándose en un valor medido (es decir, un caudal medido del sustrato que contiene CO) o de otro modo un valor de punto de ajuste (es decir, un punto de ajuste de caudal del sustrato que contiene CO). Es decir, se puede determinar un punto de ajuste para el caudal del agente neutralizante básico de acuerdo con tal valor medido o valor de punto de ajuste. De acuerdo con determinadas realizaciones, tal como resulta evidente a partir de las relaciones variables de proceso expuestas anteriormente, el punto de ajuste del caudal del agente neutralizante básico puede variar linealmente con el caudal medido del sustrato que contiene CO o el punto de ajuste del caudal del sustrato que contiene CO. Todavía más específicamente, el punto de ajuste del caudal del agente neutralizante básico se determina de acuerdo con las Fórmulas:

$$Y \cdot COFLOmv + Z$$

en donde  $COFLOmv$  representa el caudal medido del sustrato que contiene CO y el punto de ajuste del caudal del sustrato que contiene CO. Y y Z representan constantes determinadas empíricamente a partir de datos experimentales.

En tipos particulares de estas metodologías de control, el caudal del sustrato que contiene CO, a su vez, se puede controlar basándose en el valor de pH del medio de cultivo. Por ejemplo, si el valor de pH medido del medio de cultivo se encuentra por debajo de un punto de ajuste de pH (por ejemplo, uno de los valores de pH específicos indicados anteriormente), el medio de cultivo se ha vuelto demasiado ácido y, en respuesta, el caudal del sustrato que contiene CO se aumenta (por ejemplo, mediante el aumento automático de un porcentaje de apertura de una válvula de control en una línea de entrada de sustrato que contiene CO) para suministrar más CO al cultivo de las bacterias y reducir la productividad del metabolito ácido. Por el contrario, si el valor de pH medido del medio de cultivo supera este punto de ajuste de pH, el medio de cultivo se ha vuelto demasiado básico y, en respuesta, el caudal del sustrato que contiene CO se disminuye (por ejemplo, mediante la disminución automática de un porcentaje de apertura de una válvula de control en una línea de entrada de sustrato que contiene CO) para suministrar menos CO al cultivo de las bacterias y aumentar la productividad del metabolito ácido.

Como alternativa, un punto de ajuste del caudal que contiene CO se puede determinar a partir de un valor de pH

medido del medio de cultivo, representando este punto de ajuste una desviación del valor medido del caudal que contiene CO. En vista de estas consideraciones, puede resultar posible que el valor de pH medido del medio de cultivo genere los puntos de ajuste tanto del caudal del sustrato que contiene CO como del caudal del agente neutralizante básico. Sin embargo, se prefiere, en general, que el caudal medido del sustrato que contiene CO, este caudal medido (a diferencia de punto de ajuste del caudal), se use para determinar el punto de ajuste del caudal del agente neutralizante básico. El valor del pH del medio de cultivo se puede medir de manera continua o intermitente (por ejemplo, de manera periódica a intervalos regulares) usando, por ejemplo, un analizador de pH en línea. De otro modo, este valor de pH se puede medir de manera manual.

## Ejemplos

### Ejemplo comparativo 1

#### Comparación de la puesta en marcha convencional "basada en el tiempo" y la puesta en marcha "automatizada" de la invención

Se inició un proceso biológico para la conversión de CO en etanol mediante la inoculación de un biorreactor con medio de cultivo que contenía *C. ljundahlii*. El pH del medio de cultivo comenzó a descender a medida que se producía ácido acético. Las alimentaciones de sustrato que contenía CO e hidróxido de amonio al biorreactor se iniciaron cuando el pH del medio de cultivo alcanzó 5,0. El caudal del sustrato que contenía CO durante la puesta en marcha se regía por un perfil basado en el tiempo predeterminado convencional, en el que el objetivo principal era evitar el suministro en exceso de CO. Con fines comparativos, el mismo proceso se inició usando una metodología de control tal como se describe en el presente documento, en la que el caudal del hidróxido de amonio se controlaba basándose en la concentración de acetato (en forma de ácido acético) en el medio de cultivo, medida de manera automática y periódica mediante HPLC. El progreso de estas puestas en marcha comparativas se muestra en las FIG. 2 y 3, que proporcionan las concentraciones de etanol, bacterias y ácido acético en el medio de cultivo durante un período de dos días. Esta información se proporciona en el caso de la puesta en marcha basada en el tiempo convencional (FIG. 2: "Control basado en el tiempo") y en el caso de la puesta en marcha automatizada (FIG. 3: "Control automatizado"), de acuerdo con una realización representativa de la invención.

Tal como resulta evidente a partir de una comparación de las FIG. 2 y 3, la concentración del producto deseado, etanol, es menor de 2 gramos/litro (g/l) en el día 1 de la puesta en marcha basada en el tiempo, mientras que esta concentración ya es de casi 8 g/l en este punto de la puesta en marcha automatizada. Además, tal como se ilustra en la FIG. 4, resulta evidente que la puesta en marcha automatizada conduce a un aumento en el caudal del sustrato que contiene CO que es mucho más rápido, en comparación con la puesta en marcha basada en el tiempo. Esto se debe al suministro continuo de la cantidad necesaria de CO al cultivo bacteriano para la producción de etanol, sin un suministro en exceso que sea perjudicial para el crecimiento bacteriano. En el caso del perfil basado en el tiempo, el caudal del sustrato que contiene CO fue característicamente conservador, con el fin de garantizar que se evitara un suministro en exceso de CO. Como resultado, sin embargo, el suministro insuficiente de CO es inevitable y el ácido acético es el producto principal, en lugar de etanol. La FIG. 5 compara las concentraciones de bacterias a lo largo del tiempo, en estos procesos de puesta en marcha, usando estas dos metodologías de control. Tal como resulta evidente, incluso con el caudal de CO más alto en el caso de la puesta en marcha automatizada, el crecimiento microbiano no se inhibe y, de hecho, este se potencia.

Basándose en estos resultados, los procesos reivindicados pueden proporcionar beneficios de proceso significativos, en particular, en lo que respecta a la reducción del tiempo necesario para lograr un determinado objetivo de proceso, tal como una concentración de ácido acético o concentración de bacterias deseada. El objetivo puede estar asociado a la finalización de un período de puesta en marcha inicial, tal como un período de operación por lotes, en cuyo caso la transición a la operación continua se puede lograr de manera más rápida y eficaz. Esto conduce a importantes beneficios comerciales, incluyendo un consumo de materiales reducido y costes de operación globales reducidos. En el caso de un proceso que opere con dos reactores equipados con un sistema de reciclado de células, puede resultar posible tomar muestras directamente del permeado libre de células de los reactores y alimentar estas muestras a un HPLC automatizado sin ningún tratamiento adicional, es decir, sin filtración ni centrifugación de muestras. Por el contrario, los métodos de preparación de muestras convencionales, antes de la inyección a un HPLC, requieren la adición de ácidos o bases específicos, seguida de la centrifugación o filtración. Esto implica el pipeteo manual, lo que añade complejidad y da como resultado un mayor error en los resultados.

### Ejemplo 2

#### Control de puesta en marcha automatizada del flujo de $\text{NH}_4\text{OH}$ basándose en concentraciones medidas

Se inició un proceso biológico para la conversión de CO en etanol mediante la inoculación de un biorreactor con medio de cultivo que contenía *C. ljundahlii*. El pH del medio de cultivo comenzó a descender a medida que se producía ácido acético. Las alimentaciones de sustrato que contenía CO e hidróxido de amonio al biorreactor se iniciaron cuando el pH del medio de cultivo alcanzó 5,0. Basándose en la concentración de bacterias medida en el biorreactor, se determinó una concentración diana de acetato (ácido acético) y un caudal de diluyente de acuerdo con las siguientes

ecuaciones:

$$\text{Concentración diana de acetato} = A_1 \cdot \text{BIOCON}mv + B_1$$

$$\text{Caudal de diluyente} = C_1(\text{BIOCON}mv)$$

en donde  $A_1$ ,  $B_1$  y  $C_1$  se determinaron empíricamente a partir de información obtenida en procesos anteriores. Basándose en la concentración de ácido acético medida usando el HPLC en línea, el caudal de hidróxido de amonio se ajustó de manera automática, es decir, se aumentó con el fin de aumentar la producción de ácido acético por parte de las bacterias o se disminuyó con el fin de disminuir la producción de ácido acético. El flujo del sustrato que contenía CO gaseoso se aumentó o disminuyó de manera automática para mantener el pH del medio de cultivo en el pH diana = 5,0. Las concentraciones de etanol, bacterias y ácido acético con el paso del tiempo, además del caudal de diluyente, se muestran en la FIG. 6.

### Ejemplo 3

#### Puesta en marcha automatizada basándose en el pH y flujo de sustrato que contiene CO medidos únicamente

Basándose en los datos de puesta en marcha anteriores para procesos biológicos, tal como se describe en el Ejemplo 1, en el que el CO se convirtió en etanol mediante la alimentación del mismo a un medio de cultivo que contenía *C. ljundahlii*, se establecieron relaciones entre una concentración bacteriana dada en el reactor, un caudal correspondiente del sustrato que contenía CO de una composición dada que se requería para producir una productividad de ácido acético diana y un caudal de hidróxido de amonio requerida necesaria para mantener el pH del medio de cultivo en una diana dada. Estas relaciones fueron las siguientes:

$$W \cdot \text{BIOPROD} + X \cdot \text{MEFPROD} = \text{NEUFFLO} = Y \cdot \text{COFLO} + Z$$

en donde BIOPROD, METPROD, NEUTFLO y COFLO representaban, respectivamente, la productividad de las bacterias (biomasa), la productividad del ácido acético (acetato), el caudal del  $\text{NH}_4\text{OH}$  al biorreactor y el caudal del sustrato que contenía CO al biorreactor. Los factores W, X, Y y Z se determinaron empíricamente (usando regresión lineal) a partir de la información obtenida en procesos anteriores, en los que las mediciones de la productividad de las bacterias se basaron en concentraciones medidas en intervalos de tiempo sucesivos. Es decir, la productividad bacteriana medida se calculó como concentración de bacterias en el Tiempo 2 - concentración de bacterias en el Tiempo 1) / (Tiempo 2 - Tiempo 1). En estos procesos anteriores, la concentración de bacterias se midió usando un espectrofotómetro o lector de placas o sonda de biomasa y la productividad de ácido acético medida se calculó como concentración de ácido acético en el Tiempo 2 - concentración de ácido acético en el Tiempo 1) / (Tiempo 2 - Tiempo 1). Las concentraciones de ácido acético y etanol se midieron mediante HPLC. De acuerdo con los datos generados a partir de estos procesos anteriores, se determinaron los siguientes factores:  $W=1,2$ ,  $X=1,5$ ,  $Y=1,46$  y  $Z=3,21$ .

Por tanto, la relación usada para la puesta en marcha automatizada fue  $\text{NEUTFLO} = 1,46 \cdot \text{COFLO} + 3,21$ . El pH del medio de cultivo se mantuvo a 5,0 mediante el ajuste del flujo del sustrato que contenía CO de manera automática usando un controlador PID. Las relaciones anteriores se usaron para establecer el caudal de hidróxido de amonio, basándose en el caudal medido del sustrato que contenía CO.

Las concentraciones de etanol, bacterias y ácido acético con el paso del tiempo, además de los caudales del sustrato que contenía CO e hidróxido de amonio, se muestran en la FIG. 7. Ventajosamente, el crecimiento bacteriano durante el primer día fue alto, a 2,9 gramos/(litro · día), y la productividad del ácido acético fue baja, a 2,8 gramos/(litro · día). Se maximizó la productividad y concentración de etanol. Estas observaciones fueron coherentes con una puesta en marcha exitosa del proceso de conversión de CO biológica, que es fundamental antes de establecer un proceso continuo. De manera importante, las concentraciones medidas de bacterias y ácido acético en el biorreactor no se usaron directamente en esta metodología de control. Más bien, estas concentraciones se supervisaron, únicamente hasta el punto de confirmar el progreso de la operación, pero sin retroalimentación en la automatización.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para el inicio y la realización de la conversión de CO en un producto final, comprendiendo el proceso:

alimentar tanto un sustrato que contiene CO como un agente neutralizante básico a un biorreactor que comprende un medio de cultivo que contiene bacterias carboxidotróficas para generar el producto final y un metabolito ácido, en donde el caudal del agente neutralizante básico se controla basándose en la diferencia entre la concentración medida del metabolito ácido en el medio de cultivo y la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido en el medio de cultivo, en donde la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido se determina de acuerdo con la Fórmula (1):

$$A_1 \cdot \text{BIOCON}_{mv} + B_1 \quad (1)$$

en donde  $\text{BIOCON}_{mv}$  representa la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas en el medio de cultivo y en donde  $A_1$  y  $B_1$  son constantes determinadas empíricamente a partir de datos experimentales; en donde

(a) cuando la concentración medida del metabolito ácido excede la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido, se disminuye el caudal del agente neutralizante básico; y

cuando la concentración medida del metabolito ácido se encuentra por debajo de la concentración de punto de ajuste del metabolito ácido determinado, se aumenta el caudal del agente neutralizante básico.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el caudal de diluyente al biorreactor se controla basándose en la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas y en donde se determina el punto de ajuste del caudal de diluyente de acuerdo con la Fórmula (3):

$$C_1 (\text{BIOCON}_{mv}) \quad (3)$$

en donde  $\text{BIOCON}_{mv}$  representa la concentración medida de las bacterias carboxidotróficas en el medio de cultivo y en donde  $C_1$  es una constante determinada empíricamente a partir de datos experimentales.

3. Un proceso para el inicio y la realización de la conversión de CO en un producto final, comprendiendo el proceso:

alimentar tanto un sustrato que contiene CO como un agente neutralizante básico a un biorreactor que contiene bacterias carboxidotróficas para generar el producto final y un metabolito ácido, en donde el caudal de un agente neutralizante básico se controla basándose en el caudal medido del sustrato que contiene CO;

en donde el punto de ajuste del caudal del agente neutralizante básico varía linealmente con el caudal medido del sustrato que contiene CO y en donde el punto de ajuste del caudal del agente neutralizante básico se determina de acuerdo con una Fórmula:

$$Y \cdot \text{COFLO}_{mv} + Z$$

en donde  $\text{COFLO}_{mv}$  representa el caudal medido del sustrato que contiene CO y en donde Y y Z son constantes determinadas empíricamente a partir de datos experimentales.

4. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el sustrato que contiene CO se obtiene a partir de un proceso industrial seleccionado del grupo que consiste en un proceso de fabricación de acero, un proceso de fabricación de productos no ferrosos, un proceso de refinación de petróleo, un proceso de producción de biocombustible, un proceso de gasificación de carbón, un proceso de producción de energía eléctrica, un proceso de producción de negro de humo, un proceso de producción de amoníaco, un proceso de producción de metanol, una gasificación de materia orgánica, un reformado con vapor de hidrocarburos y un proceso de fabricación de coque.

5. El proceso de la reivindicación 1 o 3, en donde el metabolito ácido es ácido acético o acetato.

6. El proceso de la reivindicación 1 o 3, en donde el agente neutralizante básico es una solución de hidróxido de amonio.

7. El proceso de la reivindicación 1 o 3, en donde el producto final es etanol.

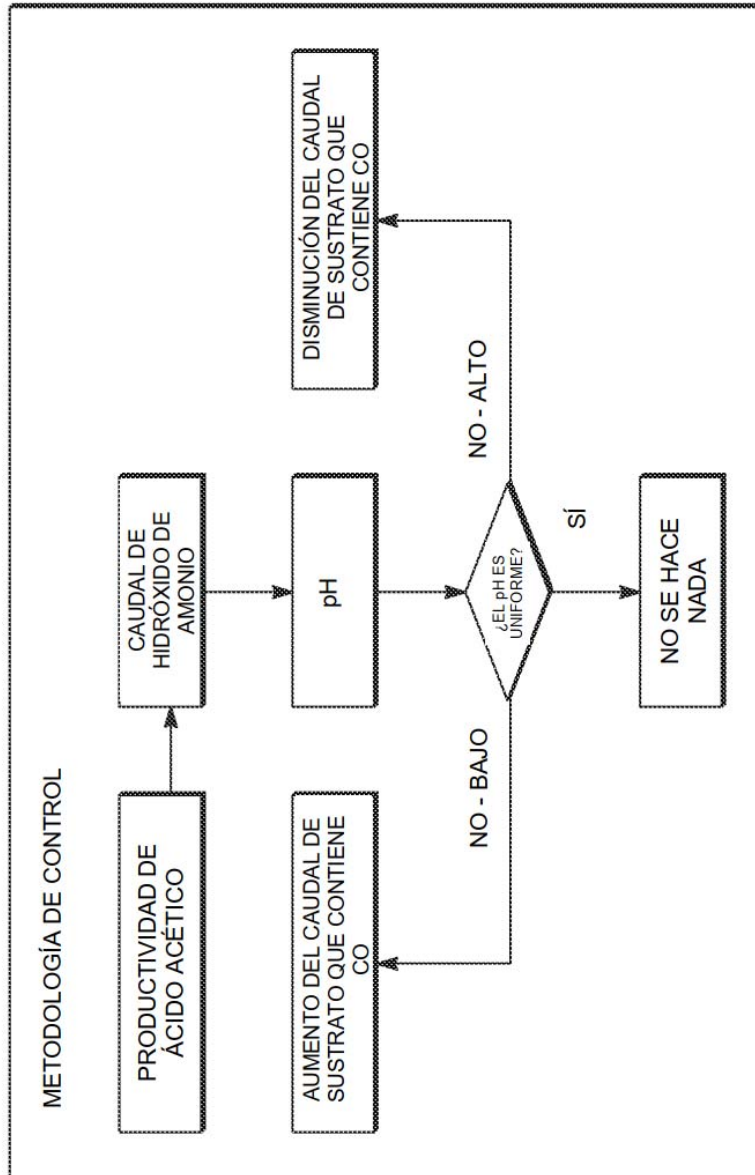


FIG. 1

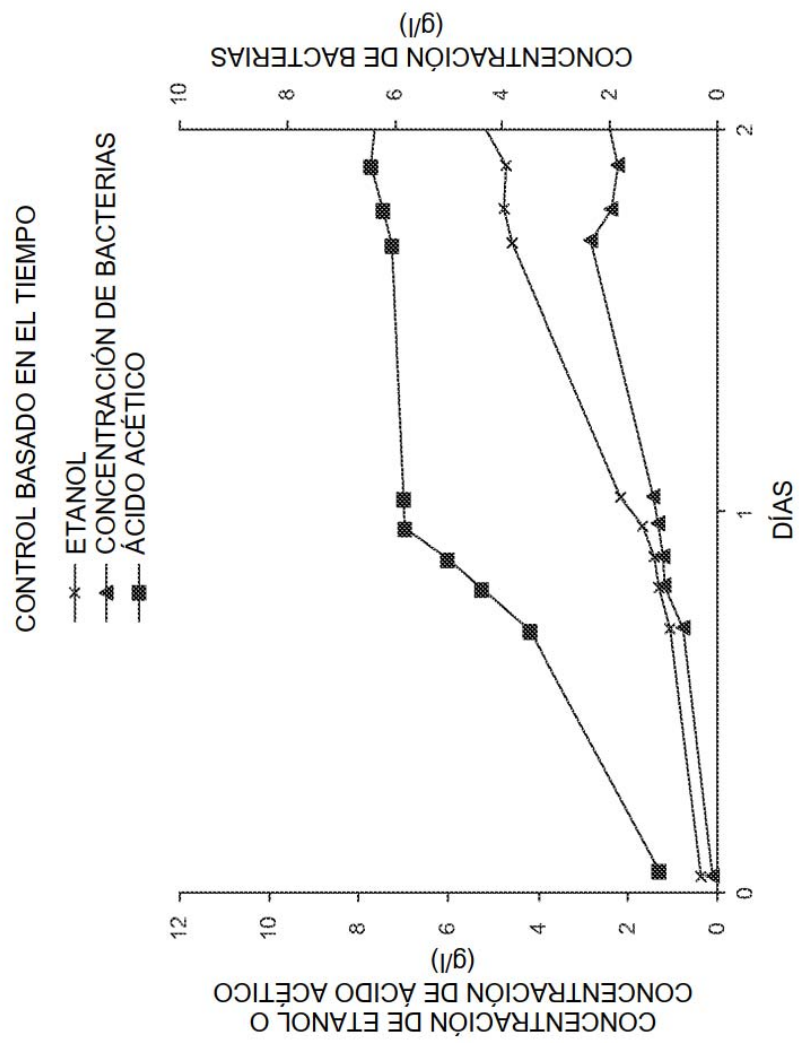
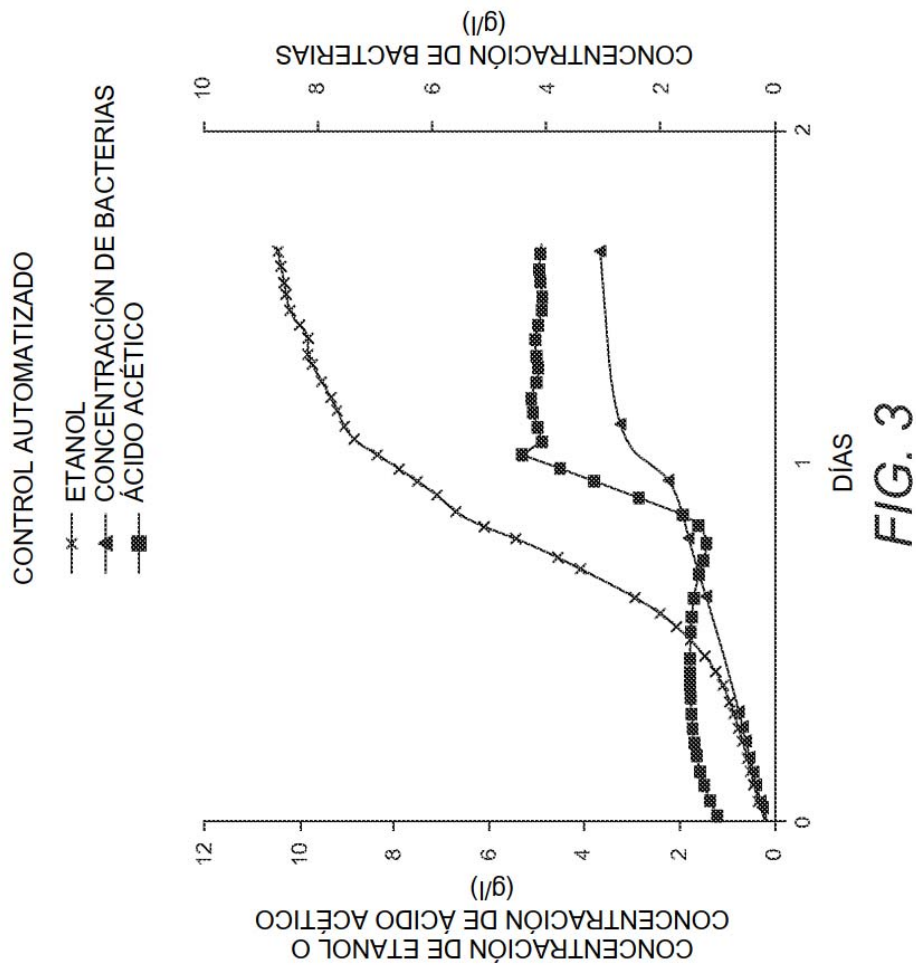


FIG. 2





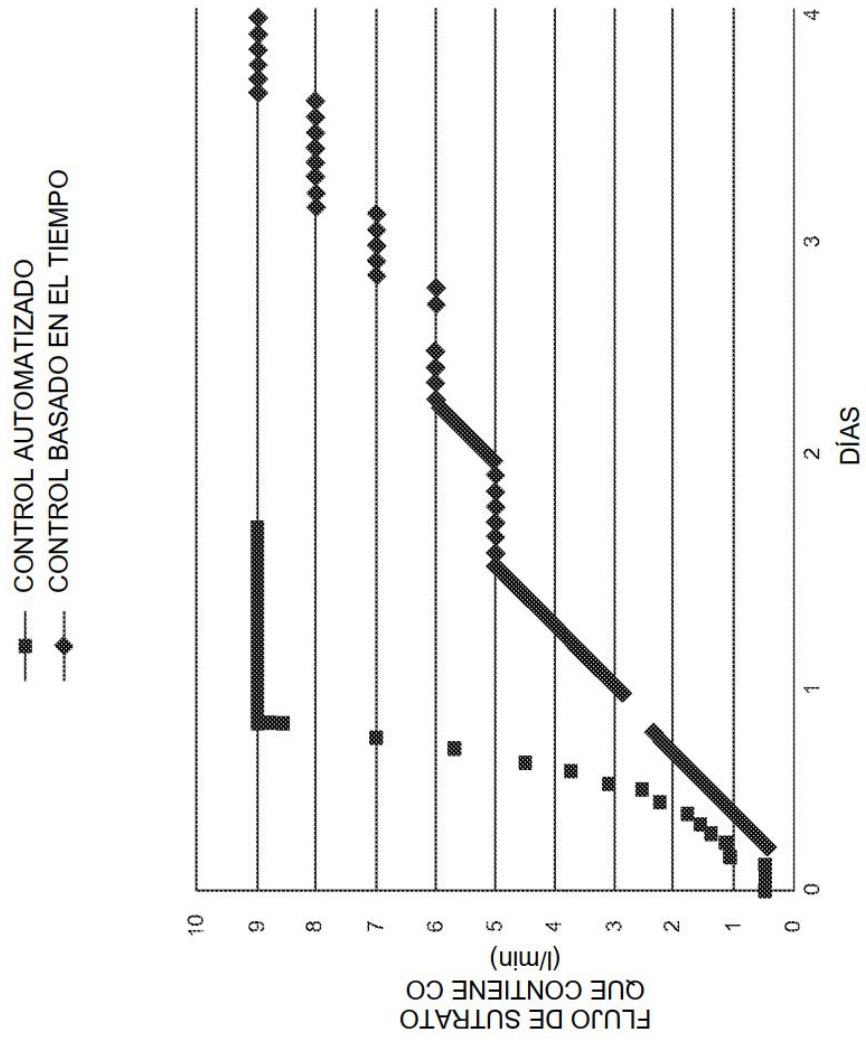


FIG. 4

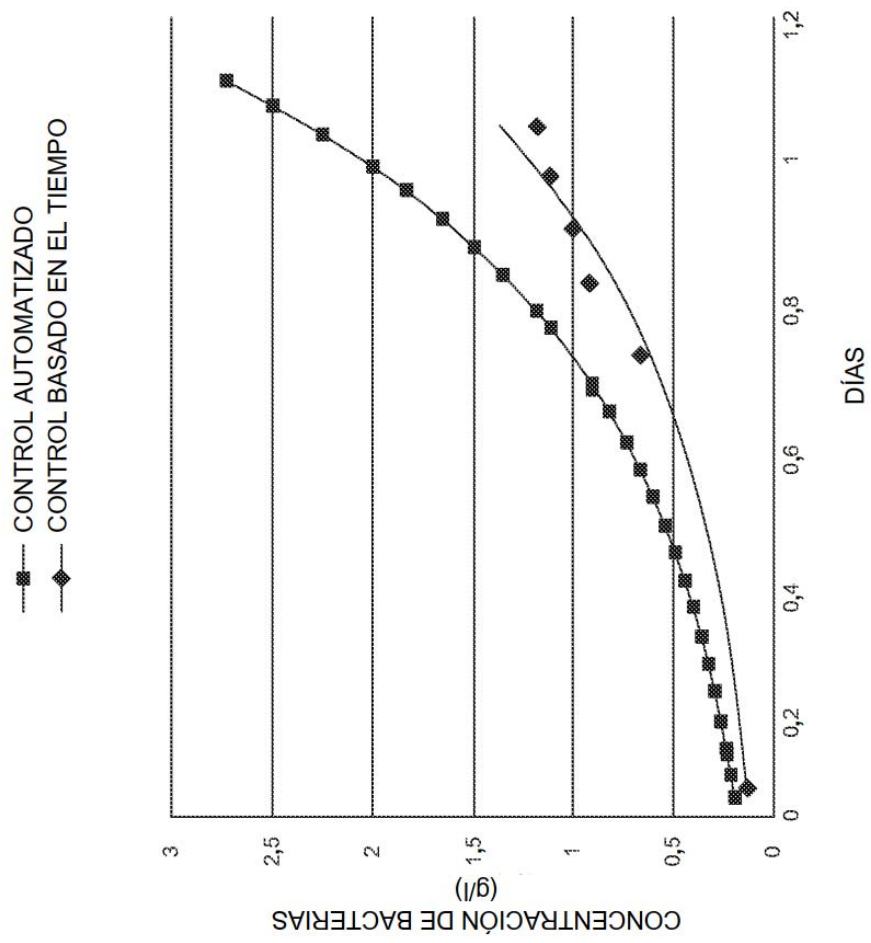


FIG. 5

CONTROL AUTOMATIZADO: BASADO EN LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS Y LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO MEDIDAS

◆ ETANOL  
 ● CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS  
 \* CAUDAL DE DILUYENTE  
 ■ ÁCIDO ACÉTICO



FIG. 6

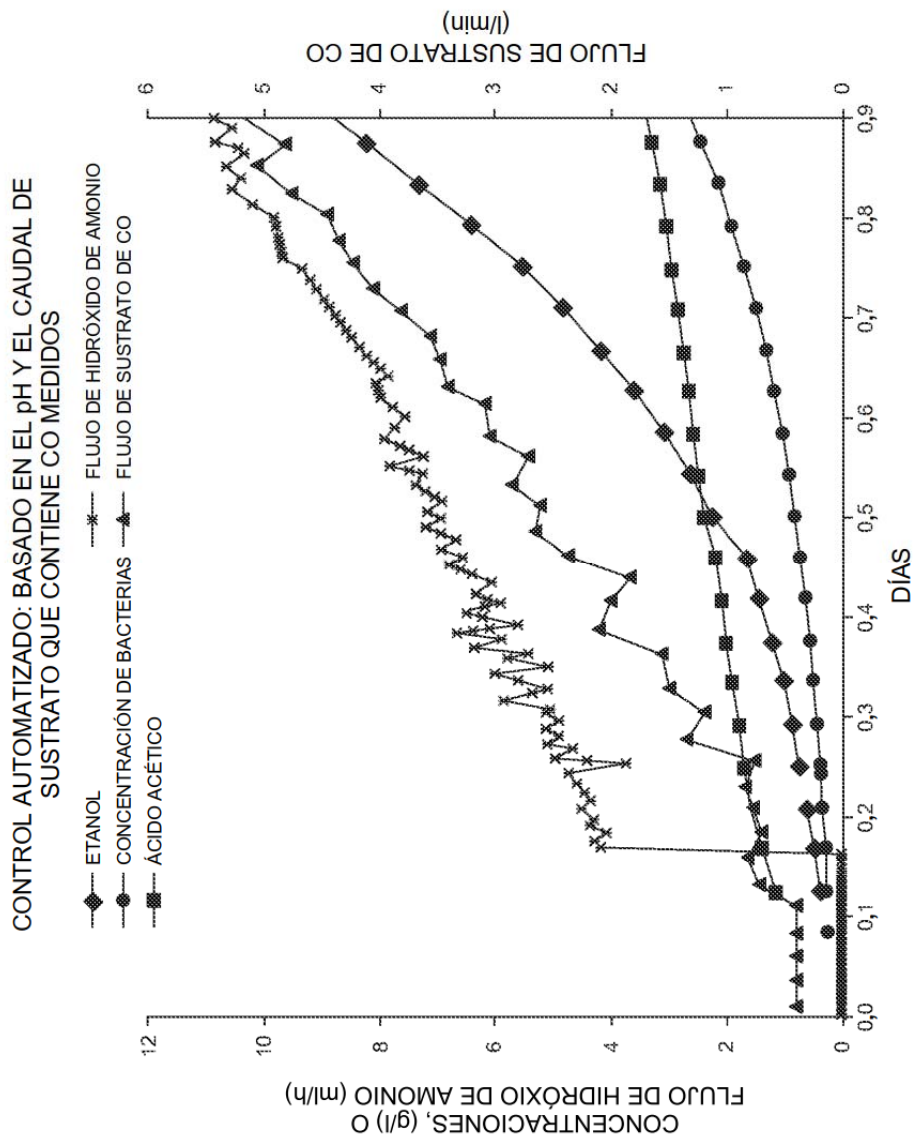


FIG. 7