

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 703**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2018** E 18382195 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023** EP 3543344

54 Título: **Procedimiento de obtención de 2,3-butanodiol mediante la fermentación de los sustratos hidrolizados de residuos orgánicos (ro) con microorganismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2024

73 Titular/es:
**BIOPOLIS, S.L. (50.0%)
C/ Catedrático Agustín Escardino Benlloch
número 9, Edificio 2, Parc Científic de la
Universitat de València
46980 Paterna (Valencia), ES y
S.A. AGRICULTORES DE LA VEGA DE VALENCIA
(50.0%)**

72 Inventor/es:
**BUSTAMANTE JARAMILLO, DANIEL ARTURO;
SANCHIS AMAT, MARÍA;
ROJAS MARTINEZ, ANTONIA MARÍA;
TORTAJADA SERRA, MARTA;
RAMÓN VIDAL, DANIEL;
FERRER PALOMARES, LILIAN;
SALA VILLAPLANA, FRANCISCO y
PASCÓ SERRA, JOSÉ IGNACIO**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 957 703 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

Procedimiento de obtención de 2,3-butanodiol mediante la fermentación de los sustratos hidrolizados de residuos orgánicos (ro) con microorganismos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de 2,3 -butanodiol mediante la fermentación de los sustratos hidrolizados de residuos sólidos o líquidos, de cualquier procedencia, con contenidos altos o medios de materia orgánica: residuos orgánicos (en adelante RO) utilizando microorganismos, particularmente mediante el uso de una cepa de *Raoultella planticola*.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

El compuesto 2,3-butanodiol (2,3-BD) es un compuesto interesante como reactivo químico en diferentes tipos de industrias gracias a su inusual estereoquímica. Tiene 3 isómeros: las formas dextro-, levo- y meso-; y las tres se producen por fermentación microbiana.

15 El isómero levo tiene una temperatura de congelación de -60°C , lo que hace que sea interesante comercialmente como anticongelante.

20 Ambos isómeros levo y dextro son excelentes componentes quirales para síntesis asimétrica y se emplean en la industria farmacéutica, agroquímica, química fina y alimentaria, y como cristales líquidos.

El 2,3-BD se deshidrata fácilmente a metil-etil-cetona (MEK), un disolvente orgánico excelente para resinas y lacas, y a butadieno, para la producción de poliésteres y poliuretanos.

25 El 2,3-BD también puede ser fácilmente deshidrogenado en acetoina y diacetil, que son agentes saborizantes empleados en la industria láctea, margarinas y cosméticos.

30 El 2,3-BD tiene aplicaciones potenciales en la producción de tintas, perfumes, agentes suavizantes e hidratantes, explosivos y plastificantes (Zeng A.-P. and Sabra W. (2011) *Curr. Op. Biotechnol* 22: 749-757).

La fermentación a 2,3-BD tiene las siguientes ventajas:

- 35 - Es menos tóxico que el etanol y que otros alcoholes, por lo que el cultivo puede alcanzar mayores concentraciones.
- Se pueden emplear los principales azúcares (hexosas y pentosas) obtenidos en procesos de hidrólisis enzimática de sustratos lignocelulósicos como fuente de carbono.
- 40 - La ruta química para la obtención de 2,3-BD es más costosa.

En el estado de la técnica se han descrito procesos de tratamiento enzimático de la biomasa para la obtención de hidrolizados ricos en azúcares fermentables para su uso en procesos de obtención de productos químicos y su escalado industrial (ver WO 2014013330, US7781191 y US7807419).

45 Además, se han divulgado procesos de obtención de 2,3-butanodiol (2,3-BD) basados en el uso de *Bacillus licheniformis* como biocatalizador y de materia prima lignocelulósica como sustrato (ver CN103497917). La cepa utilizada en CN103497917 puede producir 2,3-butanodiol a $43-55^{\circ}\text{C}$ con una conversión mayor que el 90% de la tasa de conversión teórica. La concentración de 2,3-butanodiol puede alcanzar 92 g/L con una eficiencia de la producción de 1,1 g/L/h.

50 Por tanto, sería deseable disponer de un procedimiento de obtención de 2,3-BD utilizando RO como sustrato y que esté basado en el uso de microorganismos que permitiese obtener una mayor cantidad de 2,3-BD.

55 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Un aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de 2,3-butanodiol a partir de un sustrato hidrolizado de RO (residuo orgánico) que comprende la fermentación de dicho sustrato con una cepa de *Raoultella planticola* donde:

60 RO es RSU (residuos sólidos municipales), FBRSU (fracción biodegradable de residuos sólidos municipales, estabilizados o no estabilizados), lodos de depuradora de EDAR (plantas depuradoras de aguas residuales),

residuos agrícolas y ganaderos (como purines), residuos de la industria agroalimentaria, y mezclas de los mismos, caracterizados porque la RO se genera en áreas urbanas,

la cepa *Raoultella planticola* es CECT843, CECT8158 o CECT8159, el hidrolizado de RO se utiliza como sustrato a una concentración de entre el 50% y el 100%, y el sustrato RO se fórmula con los medios de cultivo M1, M2 o M3, en donde:

M1 compuesto de 4,4 g/L K_2HPO_4 , 1,3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/L $MgSO_4$, 1,0 g/L extracto de levadura, 1 mL de solución de oligoelementos [70 mg/L $ZnCl_2$, 0,1 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L H_3BO_3 , 0,2 g $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 25 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 35 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,9 mL/L HCl];

M2 compuesto de 5,0 g/L de extracto de levadura, 5,0 g/L de triptona, 7,0 g/L de KH_2PO_4 , 7,0 g/L de K_2HPO_4 , 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,12 g/L $NaMoO_4 \cdot 7H_2O$, 0,021 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,029 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,039 g/L $Fe(NH_2)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, 2 mg/L ácido nicotínico, 0,172 mg/L Na_2SeO_3 , 0,02 mg/L $NiCl_2$, 10 mL/L de solución de oligoelementos [0,5 g/L Na_2EDTA , 0,5 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,1 g/L H_3BO_3 , 1,0 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$]; y

M3 compuesto de 0,75 g/L KCl, 1,38 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 5,35 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,28 g/L Na_2SO_4 , 0,26 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,42 g/L ácido cítrico, 2 g/L extracto de levadura, 0,3 mL/L solución de oligoelementos [34,2 g/L $ZnCl_2$, 2,7 g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,85 g/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 g/L H_3BO_3 , 23,8 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$].

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843; y

- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159; y

- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%.

A lo largo de la presente invención, los medios de cultivo M1, M2 y M3 se refieren a:

Medio 1 [M1, según Cheng K.-K., Liu Q., Zhag J.-A., Ping J.-M., Wang G.-H. (2010) *Process Biochem.* 45: 613-616]: 4,4 g/L K_2HPO_4 , 1,3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/L $MgSO_4$, 1,0 g/L Extracto de levadura, 1 mL/L de solución de elementos traza [70 mg/L $ZnCl_2$, 0,1 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L H_3BO_3 , 0,2 g $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 25 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 35 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,9 mL/L HCl.

Medio 2 [M2] 5,0 g/L extracto de levadura, 5,0 g/L triptona, 7,0 g/L KH_2PO_4 , 7,0 g/L K_2HPO_4 , 1,0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,12 g/L $NaMoO_4 \cdot 7H_2O$, 0,021 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,029 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,039 g/L $Fe(NH_2)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, 2 mg/L ácido nicotínico, 0,172 mg/L Na_2SeO_3 , 0,02 mg/L $NiCl_2$, 10 mL/L de solución de elementos traza [0,5 g/L Na_2EDTA , 0,5 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,1 g/L H_3BO_3 , 1,0 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$].

Medio 3 [M3, según Petrov&Petrova (2009) *Appl. Microb. Biotechnol.* 84: 659-665]: 0,75 g/L KCl, 1,38 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 5,35 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,28 g/L Na_2SO_4 , 0,26 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,42 g/L ácido cítrico, 2 g/L extracto de levadura, 0,3 mL/L solución de elementos traza [34,2 g/L $ZnCl_2$, 2,7 g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,85 g/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 g/L H_3BO_3 , 23,8 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$]

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;

- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%; y

- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;

- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%; y

- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
- 5 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
- la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
- que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
- que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
- la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C; y
- que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
- la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C; y
- que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente caracterizado por que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
- que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;

- se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
- el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
- que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5.

- 5 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:
- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - 10 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C;
 - que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm; y
 - que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5.

- 15 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:
- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - 20 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C;
 - que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm; y
 - que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5.

- 25 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente caracterizado por que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm.

- 30 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:
- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
 - que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm.

- 35 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:
- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - 40 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
 - que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm.

- 45 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:
- la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C;
 - 50 - que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm;
 - que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5; y
 - que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm.

- 55 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:
- la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C;
 - 60 - que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm;
 - que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5; y
 - que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch.

- 5 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- 10 - la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%; y
 - que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch, preferiblemente donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- 20 - la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%; y
 - que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch, preferiblemente donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- 25 - la cepa de *Raoultella planticola* es CECT 843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
 30 - que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch, preferiblemente donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- 35 - la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3; y
 - que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch, preferiblemente
 40 donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- 45 - la cepa de *Raoultella planticola* es CECT843;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C;
 50 - que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm;
 - que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5;
 - que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm; y
 - que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch, preferiblemente
 55 donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde:

- 60 - la cepa de *Raoultella planticola* es la cepa CECT8158 o la cepa CECT8159;
 - se emplea como sustrato el hidrolizado de RO a una concentración de entre un 50% y un 100%, y preferiblemente entre un 75% y un 80%;
 - el sustrato de RO está formulado con los medios de cultivo M1, M2 o M3;
 - la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 28°C y 32°C, y más preferiblemente a 30°C;

- que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm, y preferiblemente entre 200 rpm y 350 rpm;
- que se lleva a cabo a un pH menor de 7, y preferiblemente a un pH de 6,5;
- que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm, preferiblemente a 1,5 vvm; y
- que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch, preferiblemente donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo, y preferiblemente a los intervalos de tiempo de 16 h, 20 h, 24 h y 40 h.

En la presente invención el término "RO" o "residuo orgánico" significa residuo orgánico, e incluye todo aquel residuo con carga orgánica derivado de la presencia o la actividad humana, pudiendo comprender por tanto: RSU (residuo sólido urbano), FBRSU (fracción biodegradable de residuos sólidos urbanos, estabilizada o no), lodos de EDAR (estaciones de depuración de aguas residuales), residuos agrícolas y ganaderos (como purines), residuos de la industria agroalimentaria, así como las posibles mezclas de todos los anteriores y que se genera en núcleos urbanos o en sus municipios.

El término "RSU" o "residuo sólido urbano" se refiere a un sólido que se genera en los núcleos urbanos o en sus municipios (domicilios particulares, comercios, oficinas y servicios). Puede contener materia orgánica, papel y cartón, plásticos y vidrio.

En la presente invención el término "fed-batch" se refiere a un sistema de alimentación del sustrato en continuo o por pulsos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1. La figura muestra la fermentación de *Raoultella planticola* CECT843 en modo *fed-batch* con hidrolizado de sustrato en biorreactor de 1,5 litros. Las flechas indican los puntos en los que se añadió nuevo sustrato sin concentrar.

Fig. 2. La figura representa la fermentación de *Raoultella planticola* CECT843 en régimen de *fed-batch* en biorreactor de 1,5 litros con hidrolizado de sustrato concentrado.

Fig. 3. La figura representa la optimización de la fermentación de *Raoultella planticola* CECT843 con hidrolizado de sustrato concentrado en régimen de *fed-batch* en biorreactor de 1,5 litros.

Fig. 4. La figura representa la fermentación de *Raoultella planticola* CECT843 en régimen de *fed-batch* con hidrolizado de sustrato concentrado en biorreactor de 20L.

Fig. 5. La figura representa la fermentación de *Raoultella planticola* CECT 843 en régimen de *fed-batch* con hidrolizado de sustrato concentrado (compost) en biorreactor de 3 m³.

EJEMPLOS

- **Caracterización de distintas fracciones de RO** a lo largo del tratamiento de compostaje, siguiendo metodología NREL y mediante ensayos gravimétricos. Se elige como sustrato el material generado en un punto intermedio del proceso (anterior al cribado, tras la salida de trincheras), que proporciona una cantidad de carbohidratos adecuada y supone un ahorro al no terminar todo el proceso de compostaje.

Tabla 1. Composición de distintas fracciones de RO empleadas en el desarrollo (S1, fracción menor de Ø 80 mm; S2 fracción tras salida de trincheras, S3 Composttrasrefinado)

	S1.1	S1.2	S1.3	S2.1	S2.2	S2.3	S3.1	S3.2
Sólidos totales	39,3	36,2	41,2	57,5	66,3	63,4	66,7	59,2
Cenizas	39,0	32,8	34,5	39,7	44,4	38,0	31,6	33,5
Grasas	6,4	9,5	11,1	16,3	16,2	16,5	13,0	13,9

Extractivos H2O	24,0	24,9	21,3	12,0	13,0	13,7	17,2	17,6
Glucano	18,7	22,6	20,1	31,0	21,0	25,0	25,2	24,0
Xilano	1,6	1,8	1,6	2,4	2,7	2,4	2,3	2,2
Pectina	7,2	6,4	8,1	12,3	11,4	11,1	10,7	9,9
Lignina	3,0	4,6	3,9	5,2	4,6	6,1	6,9	6,9
Almidón	4,7	4,9	4,6	4,9	2,4	3,0	1,9	2,1
Proteína	9,2	14,6	8,6	5,5	6,5	4,4	5,0	6,0

- 5 ➤ **Puesta a punto del proceso de hidrólisis** con enzimas comerciales: se ensayaron hidrólisis con celulasas combinadas con amilasas, lipasas y proteasas. Prácticamente en todos los casos se liberan aproximadamente 20 g/L de glucosa y unos 5 g/L de xilosa.
- 10 ➤ **Ensayos de tolerancia al hidrolizado.** Se realizaron pruebas de crecimiento de las cepas con distintas concentraciones del hidrolizado utilizando las sales de los medios de cultivo propuestos para realizar las primeras pruebas de fermentación. Se analizaron los sobrenadantes por HPLC. Las bacterias empleadas fueron: *Raoultella planticola* CECT843, y *Bacillus licheniformis* DSM8785. En este caso, estas bacterias producen 2,3-BD hasta con concentración de hidrolizado del 75%. Los mejores resultados se obtuvieron con *R. planticola*.
- **Ensayos de producción.** En base a los resultados de las pruebas de tolerancia, se realizaron ensayos de fermentación más largos y muestreos para hacer un seguimiento del crecimiento y de la producción.

15 **Tabla 2.** Ensayo de producción de 2,3-butanodiol con hidrolizado al 75 o al 50% de la fracción de RO tras salida de trincheras

Cepa	Tiempo (h)	CFU /mL	Glucosa (g/L)	2,3-Butanodiol (g/L)
<i>Raoultella planticola</i> %Hidrolizado: 75	0	18·10 ⁷	15,9	-
	16	-	13,7	1,4
	24	27,7·10 ⁸	1,9	3,3
	40	-	-	5,6
	48	25,7·10 ⁹	-	5,6
	65	49,0·10 ⁹	-	4,6
<i>Bacillus licheniformis</i> %Hidrolizado: 50	0	4,7·10 ⁴	10,6	-
	16	-	-	4,3
	24	7,7·10 ⁸	-	2,2
	40	-	-	1,0
	48	21,7·10 ⁸	-	0,9
	65	20,7·10 ⁸	-	0,9

Los mejores resultados se obtuvieron con *R. planticola*, por lo que se seleccionó esta cepa para ensayos posteriores.

- 20 ➤ **Escalado del proceso.**
 - **Optimización del medio de cultivo y modo de operación**
- Se realizaron ensayos en matraces comparando medios formulados e hidrolizado sin ningún suplemento. Los resultados se recogen en la Tabla 3. El ensayo se realizó a 30°C y 150 rpm de agitación. El crecimiento celular se midió mediante conteo de células viables al inicio y al final del lote (CFU/mL). De estos resultados destaca el empleo del hidrolizado solo, sin añadir sales, para obtener niveles de 2,3-BD comparables a los que se obtienen con medios

formulados, particularmente con los medios formulados M1, M2 y M3 definidos anteriormente. Los valores más altos corresponden al medio M3, llegando a alcanzar 4,8 g/L.

Tabla 3. Producción de 2,3-butanodiol con *R. planticola* a partir de hidrolizado de RSU tras salida de trincheras

Medio	Tiempo (h)	CFU /mL	Glucosa (g/L)	2,3-BD (g/L)
Hidrolizado	0	$8,3 \cdot 10^8$	21,2	-
	16	-	17,9	1,1
	20	$2,4 \cdot 10^{11}$	15,0	2,3
M1	0	$5,3 \cdot 10^8$	19,5	-
	16	-	16,7	1,1
	20	$1,0 \cdot 10^{11}$	13,6	2,8
M2	0	$6,7 \cdot 10^8$	17,1	-
	16	-	16,0	0,5
	20	$7,3 \cdot 10^{10}$	13,9	1,9
M3	0	$8,0 \cdot 10^8$	19,4	-
	16	-	14,2	2,5
	20	$8,0 \cdot 10^8$	9,7	4,8

5

A continuación se analizó la estrategia de alimentación del cultivo, empleando un sistema *fed-batch*. El sistema se alimentó mediante pulsos de sustrato a las 16, 24 y 40 horas. Los resultados se recogen en la Tabla 4. Esta estrategia permite aumentar la cantidad de sustrato disponible en el medio sin inhibir el crecimiento de la cepa.

10

El sustrato se consume totalmente a las 48 horas y se obtienen valores de producción de 2,3-BD superiores a 14 g/L. Obteniéndose el mismo valor a partir de hidrolizado sin suplementar que con los medios formulados, lo que supone una gran ventaja de coste del proceso, ya que no requiere la adición de sales ni suplementos. Además, este medio permite realizar el seguimiento de cultivo *in situ* mediante medidas de densidad óptica (OD_{600}).

15

Tabla 4. Producción de 2,3-butanodiol con *R. planticola* CECT843 a partir de hidrolizado de RO añadido por pulsos (*fed-batch*).

Medio	Tiempo (h)	CFU /mL	Glucosa (g/L)	2,3 -BD (g/L)
Hidrolizado	0	$3,3 \cdot 10^8$	22,1	-
	16	$1,1 \cdot 10^{11}$	14,9	3,4
	24	$2,4 \cdot 10^9$	14,3	5,0
	40	$3,0 \cdot 10^{10}$	5,0	12,1
	48	$3,7 \cdot 10^{10}$	0,6	14,7
M1	0	$7,0 \cdot 10^8$	19,8	-
	16	$2,0 \cdot 10^{10}$	13,1	3,4
	24	$5,0 \cdot 10^{10}$	12,7	5,2
	40	$3,0 \cdot 10^{10}$	4,3	12,1
	48	$1,0 \cdot 10^{10}$	0,6	14,5
M2	0	$6,3 \cdot 10^8$	16,6	-
	16	$9,0 \cdot 10^{10}$	10,8	3,5
	24	$2,5 \cdot 10^9$	9,5	6,5
	40	$1,0 \cdot 10^{10}$	0,5	13,9
	48	$1,3 \cdot 10^{10}$	0,5	14,4

M3	0	$4,7 \cdot 10^8$	19,1	-
	16	$5,0 \cdot 10^{10}$	12,9	3,1
	24	$7,7 \cdot 10^{10}$	11,5	5,8
	40	$3,0 \cdot 10^{10}$	0,49	13,1
	48	$1,3 \cdot 10^{10}$	0,43	14,3

- **Ensayos de producción de 2,3-BD en sacarificación y fermentación secuenciales (SFS)**

Para esta prueba se empleó el hidrolizado obtenido a partir del sustrato S3 (Compost tras refinado). Se realizó a escala de matraz con la cepa *R. planticola* CECT843. Los resultados mostraron la tolerancia de la cepa al hidrolizado sin separar de la fracción sólida, y un rendimiento satisfactorio de producción de 2,3-BD (Tabla 5).

Tabla 5. Producción de 2,3-butanodiol con *R. planticola* CECT843 en SFS con hidrolizado de compost.

	Glucosa (g/L)	2,3-BD (g/L)	Rto. (%)
Matraz de sacarificación y fermentación secuencial	32,5	12,5	38,5

10 - **Escalado de la fermentación**

De matraz a fermentador de 1 litro

Como punto de partida del escalado se empleó un biorreactor de 1,5 L de volumen máximo, y 1 L de volumen de trabajo a partir de hidrolizado al 80% (RO tras salida de trincheras) Las condiciones fueron las siguientes:

- Temperatura: 30° C
- pH: 6,5 al inicio y luego sin control
- Agitación: 325 rpm
- Aireación: 1,5 vvm

Se empleó la estrategia de adición de sustrato en modo *fed-batch* mediante pulsos a 16, 21, 24 y 41h. Los resultados de la fermentación se recogen en la Figura 1, donde se observa disminución de la OD (concentración celular) cuando se añaden los pulsos, porque hay efecto de dilución, pero luego se recupera. Al añadir los pulsos del sustrato parece haber efecto de inhibición y se detiene la producción de 2,3BD, aunque luego se recupera. El producto mayoritario es la forma meso del 2,3-BD. Apenas se producen ácidos, lo que indica que las condiciones de fermentación son adecuadas. Se consumen tanto la glucosa como la xilosa.

25 **Adición de Sustrato concentrado:**

Se evaluó la adición de sustrato en pulsos empleando hidrolizado concentrado 10 veces, lo que permite aumentar la concentración de glucosa en el caldo. La fermentación se llevó a cabo en biorreactor de 1,5 L de volumen máximo y 1 L de volumen de trabajo con hidrolizado al 80%. Las condiciones fueron las siguientes:

- Temperatura: 30° C.
- pH: 6,5 al inicio y luego sin control.
- Agitación 325 rpm.
- Aireación 1,5 vvm

Se empleó la estrategia de adición de sustrato concentrado (200 g/L de glucosa) en modo *fed-batch* mediante pulsos a 16, 18, 24 y 36h.

35 En la fermentación con la adición de pulsos de sustrato concentrado se observó que la productividad baja a partir de las 45 horas incluso teniendo suficiente fuente de carbono disponible como para alcanzar los rendimientos deseados. Por otra parte, el pH durante la fermentación bajó hasta 5,2.

Los resultados de la fermentación se presentan en la Figura 2. En este caso se alcanzó una concentración en torno a 25 g/L.

40 **Desarrollo y optimización del proceso**

- **Optimización de las condiciones ambientales**

Comparando los resultados obtenidos con las distintas condiciones ambientales se observa que:

- El pH óptimo de operación se encuentra por debajo de 7.
- Esta está en el rango de temperatura óptimo para la fermentación.
- Se necesitan concentraciones de oxígeno moderadas.
- La cepa tolera el hidrolizado, sin embargo la cantidad óptima está en torno al 75-80% para que la cepa empiece a crecer en las mejores condiciones.

También se evaluó la necesidad de controlar el pH durante el proceso, observando que se requiere ajustar el pH al valor inicial coincidiendo con los pulsos de sustrato.

- **Ensayos con cepas mejoradas de *R. planticola***

5 A continuación, se testaron las cepas mejoradas disponibles en la colección de Biopolis para evaluar su tolerancia al hidrolizado y la producción de 2,3-BD, *Raoultella planticola* CECT8158 y *Raoultella planticola* CECT8159. Los resultados obtenidos muestran que las cepas mejoradas se comportan de forma similar a la cepa silvestre con el hidrolizado de RO como sustrato, por lo que se continuó trabajando con dicha cepa para el escalado de la fermentación (tabla 6).

10

Tabla 6. Comparativa de la cepa silvestre CECT843 con las cepas mutantes CECT8158 y CECT8159.

Cepa	Tiempo (h)	CFU /mL	Glucosa (g/L)	2,3 -BD (g/L)
<i>R. planticola</i> CECT 8158	0	$5,2 \cdot 10^8$	22,4	-
	16	$3,1 \cdot 10^{10}$	15,2	4,1
	24	$4,3 \cdot 10^{10}$	14,8	5,8
	40	$3,6 \cdot 10^{10}$	6,1	12,6
	48	$7,4 \cdot 10^{10}$	0,4	14,1
<i>R. planticola</i> CECT	0	$6,3 \cdot 10^8$	22,6	-
	16	$3,7 \cdot 10^{10}$	14,7	3,9
	24	$5,1 \cdot 10^{10}$	14,3	5,3
	40	$4,3 \cdot 10^{10}$	5,8	11,9
	48	$6,9 \cdot 10^{10}$	0,5	14,4
<i>R. planticola</i> CECT843	0	$4,7 \cdot 10^8$	19,1	-
	16	$5,0 \cdot 10^{10}$	12,9	3,1
	24	$7,7 \cdot 10^{10}$	11,5	5,8
	40	$3,0 \cdot 10^{10}$	0,49	13,1
	48	$1,3 \cdot 10^{10}$	0,43	14,3

15 - **Optimización de la Fermentación en biorreactor - Ajuste de pH.**

Finalmente, se decide seguir una estrategia de adición de sustrato de concentrado (200 g/L de glucosa) y de pulsos de NaOH para mantener los niveles de pH durante la fermentación. Se empleó un biorreactor de 1,5 L de volumen máximo, y 1 L de volumen de trabajo con hidrolizado al 80%. Las condiciones fueron las siguientes:

- 20
- Temperatura: 30°C.
 - pH inicial 6,5
 - Agitación 325 rpm.
 - Aireación 1,5 vvm

25 Se empleó la estrategia de adición de sustrato concentrado (200 g/L de glucosa) y NaOH en modo *fed-batch* mediante pulsos a 16, 24, 41 y 48h. Manteniendo el pH durante la fermentación en torno a 6. Los resultados obtenidos siguiendo esta estrategia de fermentación (Figura 3) muestran valores de 50 g/L de 2,3-BD en torno a las 70 horas de fermentación. Por lo que se decidió aumentar la escala de fermentación (20 L).

- **Escalado piloto: De biorreactor de 1,5 L a fermentador de 20 L.**

En este caso, se requiere la concentración del sustrato 10 veces a volúmenes mayores.

30 Las condiciones de fermentación empleando hidrolizado al 80% fueron las siguientes:

- Temperatura: 30°C.
- pH 6,5 al inicio.
- Agitación 200 rpm.
- Aireación 0,5 vvm

35 Se empleó la estrategia de adición de sustrato concentrado (200 g/L de glucosa) y NaOH en modo *fed-batch* mediante pulsos a 16, 24, 40 y 65h. Manteniendo el pH durante la fermentación en torno a 6. En la Figura 4 se

muestran los resultados obtenidos durante la fermentación. Se han obtenido buenos resultados en esta fase de escalado, puesto que se ha alcanzado la concentración objetivo de 50 g/L de 2,3-BD y se han reproducido los resultados obtenidos en la fase de optimización.

- 5
- **Escalado demostrativo a escala de 3 m³**
- En este caso, se preparó un hidrolizado a escala de 3 m³ con sustrato S3 (RO tras refinado) y se prepararon fracciones concentradas para la alimentación por pulsos.
- Las condiciones de fermentación empleando hidrolizado al 80% fueron las siguientes:
- 10
- Temperatura: 30°C.
 - pH 6,5 al inicio
 - Agitación 200 rpm.
 - Aireación 0,5 vvm
- 15
- Se empleó un inóculo preparado a escala de 100 L en el que el medio de cultivo era el propio hidrolizado, con el fin de adaptar la cepa al sustrato. Se empleó la estrategia de adición de sustrato concentrado (200 g/L de glucosa) y NaOH en modo *fed-batch* mediante pulsos a 12, 24, 29, 36, 48 y 54h. Manteniendo el pH durante la fermentación en torno a 6. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos durante la fermentación.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de obtención de 2,3-butanodiol a partir de un sustrato hidrolizado de RO (residuo orgánico) que comprende la fermentación de dicho sustrato con una cepa de *Raoultella planticola* donde:

5 RO es RSU (residuos sólidos municipales), FBRSU (fracción biodegradable de residuos sólidos municipales, estabilizados o no estabilizados), lodos de depuradora de EDAR (plantas depuradoras de aguas residuales), residuos agrícolas y ganaderos (como purines), residuos de la industria agroalimentaria, y mezclas de los mismos, caracterizados porque la RO se genera en áreas urbanas,
 10 la cepa *Raoultella planticola* es CECT843, CECT8158 o CECT8159, el hidrolizado de RO se utiliza como sustrato a una concentración de entre el 50% y el 100%, y el sustrato RO se fórmula con los medios de cultivo M1, M2 o M3, en donde:

15 M1 compuesto de 4,4 g/L K_2HPO_4 , 1,3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/L $MgSO_4$, 1,0 g/L extracto de levadura, 1 mL de solución de oligoelementos [70 mg/L $ZnCl_2$, 0,1 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L H_3BO_3 , 0,2 g $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 25 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 35 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,9 mL/L HCl];
 M2 compuesto de 5,0 g/L de extracto de levadura, 5,0 g/L de triptona, 7,0 g/L de KH_2PO_4 , 7,0 g/L de K_2HPO_4 , 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,12 g/L $NaMoO_4 \cdot 7H_2O$, 0,021 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,029 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,039 g/L $Fe(NH_2)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, 2 mg/L ácido nicotínico, 0,172 mg/L Na_2SeO_3 , 0,02 mg/L $NiCl_2$, 10 mL/L de solución de oligoelementos [0,5 g/L Na_2EDTA , 0,5 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,1 g/L H_3BO_3 , 1,0 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$]; y
 20 M3 compuesto de 0,75 g/L KCl, 1,38 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 5,35 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,28 g/L Na_2SO_4 , 0,26 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,42 g/L ácido cítrico, 2 g/L extracto de levadura, 0,3 mL/L solución de oligoelementos [34,2 g/L $ZnCl_2$, 2,7 g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,85 g/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 g/L H_3BO_3 , 23,8 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$].

25 2.- El procedimiento según la reivindicación 1, donde la temperatura a la que se lleva a cabo es de entre 25°C y 35°C.

30 3.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1º 2, caracterizado por que se lleva a cabo bajo una agitación de entre 100 rpm y 400 rpm.

4.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se lleva a cabo a un pH menor de 7.

35 5.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que se lleva a cabo con una aireación de entre 0,7 vvm y 2,0 vvm.

6.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una etapa de alimentación del cultivo mediante alimentación en modo fed-batch.

40 7.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la alimentación del sustrato mediante fed-batch se llevó a cabo mediante pulsos de sustrato a diferentes intervalos de tiempo.

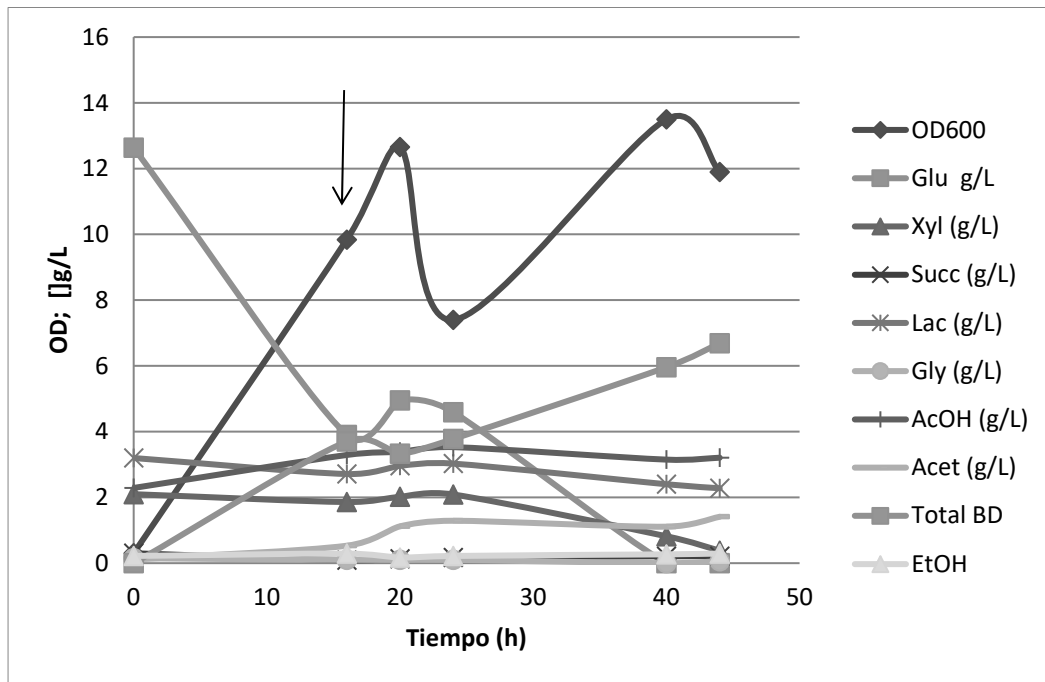


Figura 1

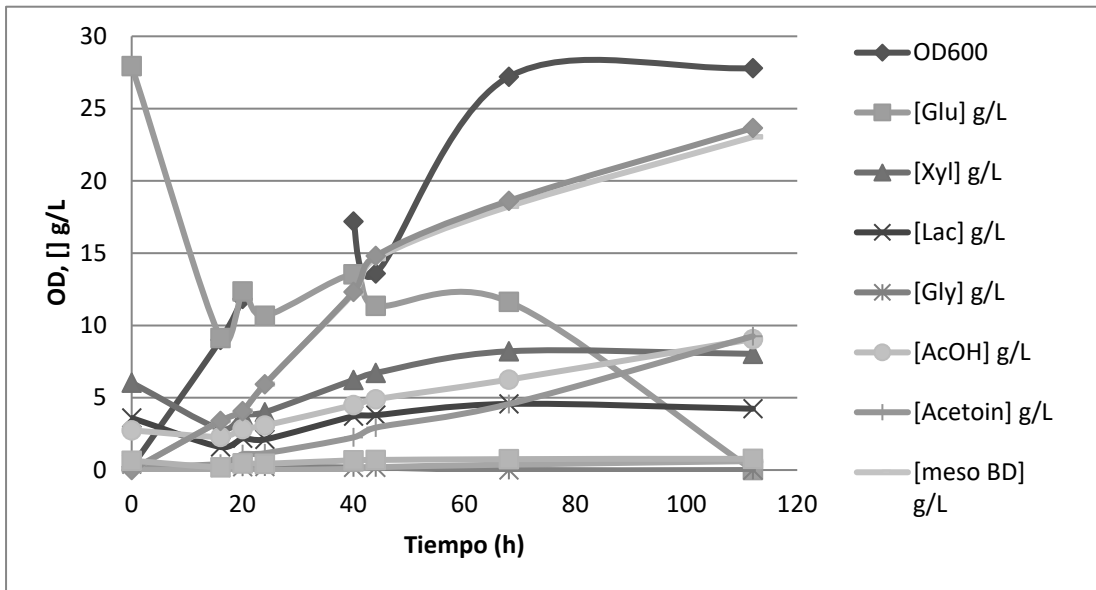


Figura 2

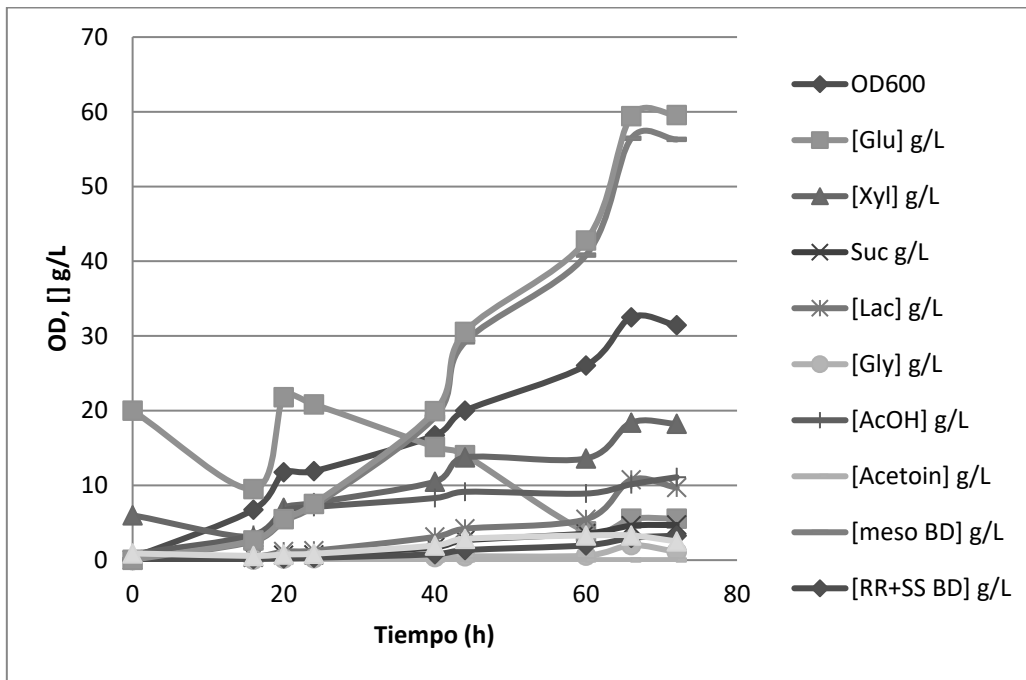


Figura 3

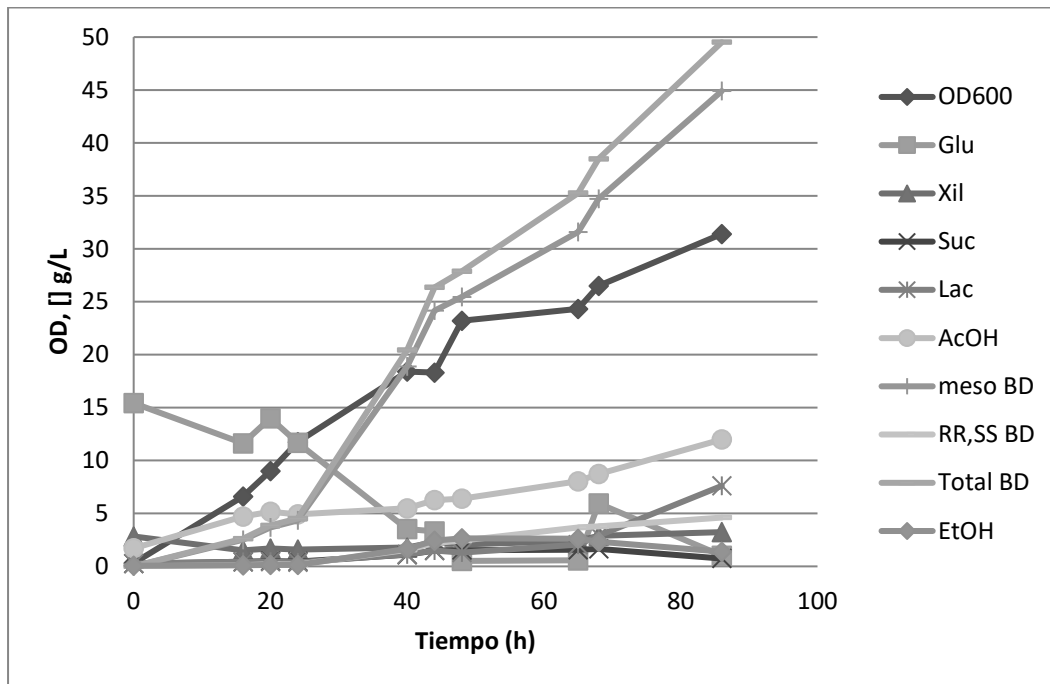


Figura 4

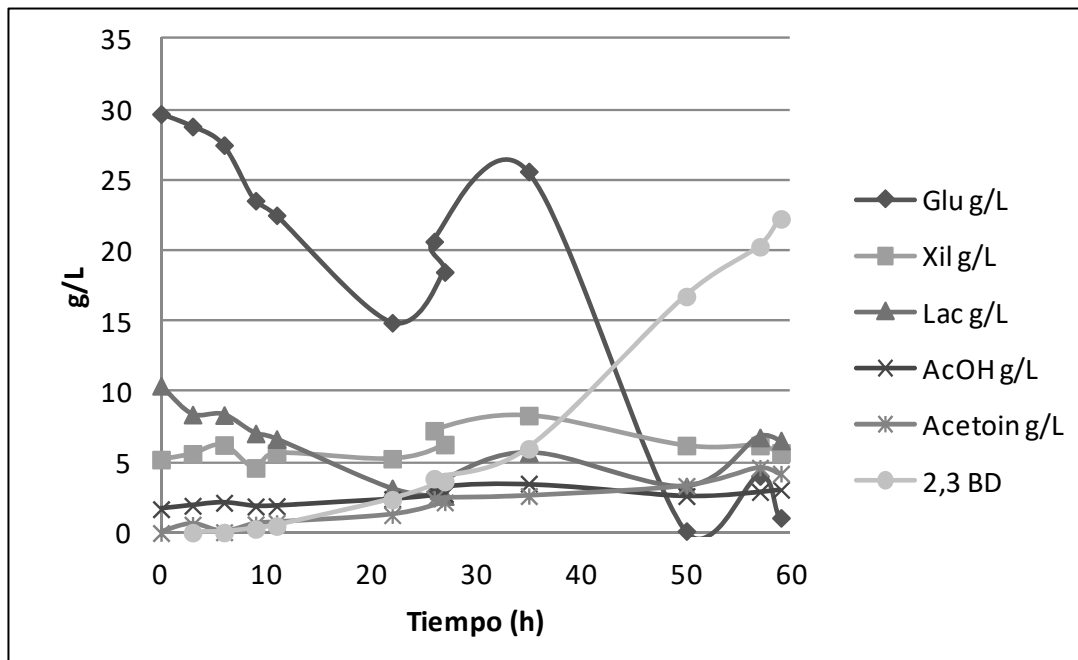


Figura 5