

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 786**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2009 E 09720425 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2250274**

54 Título: **Proceso de producción de alcohol microbiano**

30 Prioridad:

12.03.2008 US 36061 P

28.07.2008 US 84257 P

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

28.05.2015

73 Titular/es:

LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)

24 Balfour Road Parnell

Auckland 1052, NZ

72 Inventor/es:

SIMPSON, SEAN, DENNIS;

COLLET, CHRISTOPHE;

TRAN, PHUONG, LOAN;

AL-SINAWI, BAKIR;

FORSTER, RICHARD, LLEWELLYN, SYDNEY;

ROWE, MATTHEW, JAMES;

CHAN, GARY;

MAHAR, KELLY, MARIE y

FUNG, JENNIFER, MON, YEE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 536 786 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de producción de alcohol microbiano

Campo

5 La presente invención se refiere a la producción de alcoholes desde sus ácidos correspondientes mediante fermentación microbiana, por fermentación microbiana de sustratos que comprenden CO.

Antecedentes

10 Los alcoholes son de uso en muchas industrias que incluyen las industrias del perfume, farmacéutica y del combustible. Etanol y butanol, por ejemplo, están convirtiéndose rápidamente en combustibles de transporte líquido principales alrededor del mundo. Los procesos para la producción de varios alcoholes se conocen. La producción de alcohol industrial es en gran parte sintética, derivando de procesos petroquímicos. Sin embargo, la fermentación microbiana puede usarse también para producir alcoholes, por ejemplo, biocombustibles, y está volviéndose cada vez más popular.

15 Los biocombustibles para transporte son sustitutos atractivos para la gasolina y están penetrando rápidamente los mercados de combustible como mezclas de baja concentración. Los biocombustibles, derivados de fuentes vegetales naturales, son más sostenibles medioambientalmente que los derivados de recursos fósiles (tales como gasolina), permitiendo su uso una reducción en los niveles del denominado gas de dióxido de carbono fósil (CO₂) que se libera a la atmósfera como resultado de la combustión del combustible. Además, los biocombustibles pueden producirse localmente en muchas geografías, y pueden actuar para reducir la dependencia de los recursos de energía fósil importados. Los alcoholes adecuados para usar como biocombustibles incluyen etanol, butanol y 2,3-butanol, entre otros.

20 El etanol está convirtiéndose rápidamente en un combustible de transporte líquido rico en hidrógeno principal alrededor del mundo. El consumo mundial de etanol en 2005 fue de 12,2 billones de galones (55 billones de litros) estimados. El mercado global para la industria de etanol combustible se ha predicho además que continuará creciendo bruscamente en el futuro, debido a un interés creciente en etanol en Europa, Japón, los EE.UU. y varias naciones en desarrollo.

25 Por ejemplo, en los EE.UU., el etanol se usa para producir E10, una mezcla al 10% de etanol en gasolina. En mezclas E10, el componente de etanol actúa como un agente oxigenante, mejorando la eficiencia de combustión y reduciendo la producción de contaminantes del aire. En Brasil, el etanol satisface aproximadamente el 30% de la demanda de combustible de transporte, tanto como un agente oxigenante mezclado en la gasolina, o como un combustible puro en su propio derecho. Además, en Europa, los intereses medioambientales que rodean las consecuencias de las emisiones de Gas Invernadero (GHG) han sido el estímulo para que la Unión Europea imponga a los estados miembros un resultado bajo mandato para el consumo de biocombustibles de transporte sostenibles.

30 También puede usarse el butanol como un combustible en un motor de combustión interna. Es de varias formas más similar a la gasolina que lo es al etanol. Como el interés en la producción y aplicación de combustibles medioambientalmente sostenibles se ha reforzado, el interés en procesos biológicos para producir butanol (a menudo denominado como bio-butanol) ha aumentado. El butanol puede producirse por fermentación microbiana de biomasa a partir de cultivos tales como remolacha azucarera, maíz, trigo y caña de azúcar. Sin embargo, el coste de estas existencias de alimento de carbohidratos está influido por su valor como alimento humano o alimento animal y el cultivo de cultivos productores de almidón o sacarosa para la producción de butanol no es económicamente sostenible en todas las geografías. Por lo tanto, es de interés desarrollar tecnologías para convertir fuentes de carbono menos costosas y/o más abundantes en butanol combustible.

35 Las bacterias anaeróbicas, tal como las del género *Clostridium*, se ha demostrado que producen etanol desde CO, CO₂ y H₂ por medio de la ruta bioquímica de acetil CoA. Por ejemplo, varias cepas de *Clostridium ljungdahlii* que producen etanol de gases se describen en los documentos WO 00/68407, EP 117309, Patentes de EE.UU. núms. 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, WO 98/00558 y WO 02/08438. La bacteria *Clostridium autoethanogenum sp* se conoce también por producir etanol desde gases (Abrini et al, Archives of Microbiology 161, págs. 345-351 (1994)).

40 Sin embargo, la producción de etanol mediante microorganismos por fermentación de gases está asociada típicamente con coproducción de acetato y/o ácido acético. Ya que algún carbono disponible se convierte en acetato/ácido acético en vez de etanol, la eficiencia de producción de etanol usando dichos procesos de fermentación puede ser menor de la deseable. Además, a menos que el subproducto de acetato/ácido acético pueda usarse para algún otro propósito, puede plantear un problema de eliminación de residuos. El acetato/ácido acético se convierte a metano por los microorganismos y por lo tanto tiene el potencial de contribuir a las emisiones de GHG. Otros productos de desecho, tal como ácido butírico/butirato pueden producirse también durante los procesos de fermentación usados normalmente.

Además, los procesos de fermentación biológica, que utilizan típicamente levadura o bacterias, pueden estar limitados a la producción de uno o dos alcoholes que un organismo particular es capaz de producir desde el sustrato en que está creciendo (por ejemplo, un carbohidrato o gas que comprende monóxido de carbono). Si se desea producir un alcohol diferente, un microorganismo diferente puede necesitarse que se consiga. En muchos casos, uno puede no ser capaz de conseguir unas bacterias capaces de producir el alcohol deseado. Por lo tanto, es de interés desarrollar tecnologías para convertir recursos de carbono de menor coste y/o más abundantes tal como ácidos orgánicos, en productos deseables, tal como etanol combustible.

Los procesos para la conversión microbiana de ácidos a sus alcoholes correspondientes se han descrito previamente: Patente de EE.UU. 4.851.344; White y Simon, Arch Microbiol (1992) 158: 81-84; Huber et al, Arch Microbiol (1995) 164: 110-118. Sin embargo, estos métodos también padecen un número de desventajas. Por ejemplo, necesitan el uso de mediadores químicos muchos de los cuales son tóxicos y/o caros. Además, los métodos usan extractos celulares, o células aisladas que están latentes y se necesita que se desactiven y resuspendan en tampón antes de la conversión de los ácidos a alcoholes. Estas etapas de procesado son de trabajo intensivo y aumentan el riesgo de que los microbios se expongan al oxígeno, se lisen o se dañen de otra forma.

La presente invención proporciona procesos para producir alcoholes valiosos por fermentación bacteriana anaeróbica que superan ciertas desventajas de los métodos conocidos en la técnica, o al menos proveen al público con una elección útil.

Resumen de la invención

En un amplio aspecto, la invención proporciona un método para convertir un ácido a su alcohol correspondiente usando bacterias metabólicamente activas creciendo en un sustrato que comprende monóxido de carbono y/o hidrógeno.

En realizaciones particulares, el método incluye:

- a. cultivar en un biorreactor, una o más cepas de unas bacterias carboxidotróficas en presencia de un sustrato que comprende CO para producir uno o más ácidos y opcionalmente uno o más alcoholes; y
- b. perturbar el cultivo microbiano, de manera que al menos un ácido se convierte a al menos un alcohol.

Típicamente, al menos una parte del(de los) ácido(s) producido(s) en la etapa (a) se convierte(n) a alcohol(es) en la etapa (b). Adicionalmente o alternativamente, puede añadirse ácido adicional al biorreactor durante la etapa (a) y/o etapa (b) y convertirse a al menos un alcohol.

En ciertas realizaciones, perturbar el cultivo microbiano incluye uno o más de:

- alterar el pH de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- alterar el ORP de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- añadir uno o más ácidos al biorreactor;
- añadir uno o más agentes reductores al biorreactor;
- alterar la concentración de CO en un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- alterar la presión parcial de CO en el biorreactor, en donde el sustrato que comprende CO es gaseoso.

En realizaciones particulares, la etapa de alterar la concentración de CO incluye aumentar la concentración de CO en el medio nutriente líquido en al menos 1 mmol.

En otro amplio aspecto, la invención proporciona un método para la producción de un alcohol, comprendiendo el método al menos las etapas de:

(a) cultivar en un biorreactor una o más cepas de bacterias en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono;

(b) añadir un ácido al biorreactor cuando la una o más cepas de bacterias están en una fase de conversión para producir el alcohol correspondiente al ácido; y

en donde el alcohol producido no es un alcohol que la una o más cepas de bacterias son capaces de producir cuando crecen en dicho sustrato en la ausencia de dicho ácido.

En realizaciones particulares de los aspectos anteriores, el método se lleva a cabo en la ausencia de un mediador.

En una realización, dos o más ácidos se añaden al biorreactor para producir dos o más alcoholes correspondientes.

En ciertas realizaciones, la una o más bacterias son bacterias que son capaces de usar la ruta de aldehído óxido-reductasa (AOR) para reducir un ácido a su alcohol correspondiente. Las bacterias apropiadas incluyen especies de los géneros *Clostridia*, *Moorella*, *Eubacteria*, *Acetobacteria*, *Butyribacterium* y *Desulfobacterium*. En una realización particular la bacteria es *Clostridium autoethanogenum*.

- 5 Típicamente, el ácido es un ácido monocarboxílico o dicarboxílico. En realizaciones particulares el ácido se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-pentanoico, ácido n-hexanoico y ácido benzoico.

En realizaciones particulares, el alcohol producido se elige de etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol y alcohol bencílico.

- 10 En otro amplio aspecto, la invención proporciona un método para la producción de butanol, comprendiendo el método al menos las etapas de:

(a) cultivar en un biorreactor una o más cepas de bacterias que se adaptan a producir un alcohol distinto de butanol en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono;

(b) producir butanol añadiendo butirato al biorreactor cuando la una o más cepas de bacterias está(n) produciendo de forma activa el alcohol distinto de butanol.

- 15 En otro amplio aspecto, la invención proporciona un método para la producción de butanol, comprendiendo el método al menos las etapas de:

(a) cultivar en un biorreactor una o más cepas de bacterias que se adaptan para producir etanol en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono;

- 20 (b) producir butanol añadiendo butirato al biorreactor cuando la una o más cepas de bacterias está(n) produciendo de forma activa etanol.

En otro amplio aspecto, la invención proporciona un método para la producción de un alcohol, comprendiendo el método al menos las etapas de:

(a) cultivar en un biorreactor *Clostridium autoethanogenum* en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono;

- 25 (b) añadir un ácido al biorreactor cuando la *Clostridium autoethanogenum* está en una fase de conversión para producir el alcohol correspondiente al ácido; y

en donde el alcohol producido no es un alcohol que *Clostridium autoethanogenum* es capaz de producir cuando crece en dicho sustrato en ausencia de dicho ácido.

- 30 En un amplio aspecto preferido, la invención proporciona un método para la producción de butanol, comprendiendo el método al menos las etapas de:

(a) cultivar en un biorreactor *Clostridium autoethanogenum* en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono;

(b) añadir butirato al biorreactor cuando *Clostridium auroethanogenum* está en una fase de conversión para producir butanol.

- 35 Los métodos de la invención se realizan típicamente en ausencia de un mediador.

En realizaciones particulares, el ácido añadido a un biorreactor de acuerdo con los métodos de la invención se produce por fermentación microbiana de un sustrato que comprende monóxido de carbono.

En ciertas realizaciones, las bacterias se cultivan en un medio líquido en ausencia de extracto de levadura y/o peptona. En una realización, el medio es LM23 o LM33 como se describe después en esta memoria.

- 40 En otro amplio aspecto, la invención proporciona un método para producir uno o más alcoholes, comprendiendo el método al menos las etapas de:

(a) En un primer biorreactor fermentar un sustrato para producir uno o más ácidos;

(b) En el segundo biorreactor cultivar una o más cepas de bacterias en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono;

- 45 (c) Introducir el uno o más ácidos de (a) en el segundo biorreactor en un momento cuando la una o más cepas de bacterias están en una fase solventogénica para producir los alcoholes correspondientes al uno o más ácidos; y

en donde el alcohol producido no es un alcohol que la una o más cepas de bacterias son capaces de producir cuando crecen en dicho sustrato en la ausencia de dicho ácido.

En realizaciones particulares, el método se lleva a cabo en ausencia de mediador.

5 En ciertas realizaciones la una o más cepas de bacterias en el segundo biorreactor son como se definen antes en esta memoria.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir alcoholes desde la fermentación bacteriana anaeróbica de un ácido en un biorreactor, en presencia de un sustrato que comprende CO.

En una realización, el sustrato se proporciona a una concentración de CO tal que se promueve la conversión de ácido a alcohol.

10 En una realización, la concentración de CO está por encima de una concentración umbral suficiente, de manera que se promueve la conversión de ácido a alcohol. Proporcionar CO a la fermentación por encima de esta concentración umbral suficiente reduce o previene la producción de ácido y/o reduce o evita el crecimiento microbiano, mientras promueve la conversión de ácido a alcohol.

15 En una realización, el sustrato se proporciona a una concentración de CO en un medio de fermentación de al menos aproximadamente 2,5 mmoles/L. En una realización, la concentración de CO es al menos aproximadamente 2,75 mmoles/L. En una realización, la concentración de CO es al menos aproximadamente 3 mmoles/L. En una realización, la concentración es al menos aproximadamente 3,5 mmoles/L.

20 Los expertos en la técnica apreciarán sobre la consideración de esta descripción que hay muchos métodos para aumentar la solubilidad de CO en medios de fermentación, que incluyen sin limitación variación de temperatura y/o la adición de agentes de solubilización tal como aceites. Dichos métodos pueden emplearse en la práctica de la presente invención como necesarios o deseables para alcanzar una concentración de CO particular en los medios de fermentación.

25 En una realización, el sustrato que comprende CO es un sustrato gaseoso, y la cantidad de CO disuelto en unos medios de fermentación es proporcional a presión parcial de CO en la fermentación. Como tal, la concentración umbral suficiente en los medios de fermentación puede alcanzarse aumentando la presión parcial de CO. En una realización, el sustrato gaseoso se proporciona de manera que la presión parcial de CO es al menos aproximadamente 255,106 kPa (37 psi). En otra realización, la presión parcial de CO es al menos aproximadamente 324,053 kPa (47 psi).

30 De acuerdo con los métodos de la invención, el ácido adicional puede suministrarse al biorreactor y convertirse en alcohol.

En varias realizaciones de la invención, el método incluye una etapa para capturar y recuperar uno o más alcoholes producidos por la fermentación.

35 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir alcoholes y/o ácidos, el método que incluye fermentar de forma anaeróbica un primer sustrato en un biorreactor para producir uno o más productos que incluyen alcoholes y/o ácidos; en donde un segundo sustrato que comprende CO se añade a un punto temporal deseado tal como la producción de alcohol, tal como etanol, respecto a ácido, tal como acetato, aumenta.

En una realización, añadir el segundo sustrato que comprende CO da por resultado al menos una parte del ácido que se convierte en alcohol, con tal que la concentración de CO disuelto resultante esté a o por encima de una concentración de umbral suficiente para la fermentación.

40 En una realización, el primer sustrato también incluye CO; sin embargo, el método no está limitado a dichas realizaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el primer sustrato puede incluir uno o más carbohidratos o piruvato. Carbohidratos adecuados pueden incluir aunque no estar limitados a celulosa, hidrolisato de celulosa, almidón, hidrolisato de almidón, glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa o lactosa. En algunas realizaciones, el carbohidrato es fructosa o xilosa. En otras realizaciones, el primer sustrato puede comprender CO₂ y/o H₂ o cualquier otro componente adecuado para producir ácidos y/o alcoholes por fermentación.

45 En varias realizaciones, el método incluye la etapa de capturar y recuperar uno o más alcoholes producidos por la fermentación.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir alcoholes y/o ácidos, incluyendo el método las etapas de:

50 (a) proporcionar un sustrato que comprende CO a una primera concentración a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos; y

- (b) fermentar de forma anaeróbica el cultivo en el biorreactor para producir uno o más productos que incluyen alcoholes y/o ácidos de dicho sustrato,
- en donde la concentración del sustrato proporcionado al biorreactor puede aumentarse opcionalmente a un punto temporal deseado, de manera que la producción de alcoholes respecto a ácidos aumenta.
- 5 En varias realizaciones, aumentar la concentración del sustrato da por resultado al menos una parte del ácido convirtiéndose en alcohol y/o la concentración del sustrato puede aumentarse por encima de un umbral suficiente, en donde al menos una parte del ácido se convierte en alcohol.
- En varias realizaciones, el método incluye la etapa para capturar y recuperar uno o más productos producidos por la fermentación.
- 10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir alcoholes y/o ácidos, incluyendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a una primera presión parcial de CO en un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos; y
- (b) fermentar de forma anaeróbica el cultivo en el biorreactor para producir uno o más productos que incluyen etanol y/o ácido acético de dicho sustrato,
- 15 en donde la presión parcial de CO puede aumentarse opcionalmente a un punto temporal deseado de manera que la producción de etanol respecto a acetato aumenta.
- En una realización, el método incluye monitorizar el crecimiento microbiano y/o la concentración de uno o más productos y/o concentración de CO, en donde a un producto deseado y/o concentración de CO, la presión parcial de CO puede aumentarse. En una realización, la presión parcial de CO puede aumentarse por encima de 186,158 kPa (27 psi).
- 20 En varias realizaciones, aumentar la presión parcial de CO da por resultado al menos una parte del ácido convirtiéndose en alcohol y/o la presión parcial de CO puede aumentarse por encima de un umbral suficiente, en donde al menos una parte del ácido se convierte en alcohol.
- 25 En varias realizaciones, el método incluye la etapa de capturar y recuperar alcohol producido por la fermentación.
- Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de regulación de crecimiento microbiano y/o producción de ácido, incluyendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a una primera presión parcial de CO en un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos; y
- 30 (b) fermentar de forma anaeróbica el cultivo en el biorreactor para producir uno o más productos que incluyen etanol y/o ácido acético de dicho sustrato,
- en donde la presión parcial de CO puede aumentarse a un punto temporal deseado de manera que el crecimiento microbiano y/o producción de ácido se reduce o inhibe sustancialmente.
- 35 En varias realizaciones, aumentar la presión parcial de CO da por resultado al menos una parte del ácido convirtiéndose en alcohol y/o la presión parcial de CO puede aumentarse por encima de un umbral suficiente, en donde al menos una parte del ácido se convierte en alcohol.
- En una realización, el crecimiento microbiano y/o producción de ácido puede aumentarse/promoverse (o reiniciarse) cuando la presión parcial de CO se reduce.
- En varias realizaciones, el método incluye la etapa para capturar y recuperar alcohol producido por la fermentación.
- 40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para regular la producción de alcohol, incluyendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a una primera presión parcial de CO en un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos;
- (b) fermentar de forma anaeróbica el cultivo en el biorreactor para producir uno o más productos que incluyen etanol y/o ácido acético a partir de dicho sustrato;
- 45 (c) aumentar la presión parcial de CO por encima de un umbral suficiente, tal como al menos una parte del ácido se convierte en etanol; y

(d) opcionalmente reducir a partir de ahí la presión parcial de CO por debajo del umbral de manera que el crecimiento microbiano y la producción de ácido se promueven.

En varias realizaciones, la producción del alcohol y ácido y/o crecimiento microbiano puede monitorizarse a lo largo de la fermentación y/o las etapas (c) y (d) se repiten al menos una vez.

5 Las realizaciones de la invención encuentran aplicación particular en la fermentación de ácidos en presencia de un sustrato gaseoso que comprende CO. El sustrato puede comprender un gas obtenido como un subproducto de un proceso industrial. En ciertas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de productos metálicos ferrosos, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de la biomasa, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En una realización de la invención, el sustrato gaseoso es gas de síntesis. En una realización, el sustrato gaseoso comprende un gas obtenido de una planta siderúrgica.

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

15 En diversas realizaciones, la fermentación se lleva a cabo usando un cultivo de una o más cepas de bacterias carboxidotróficas. En diversas realizaciones, la bacteria carboxidotrófica se selecciona de *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*. En una realización, la bacteria carboxidotrófica es *Clostridium autoethanogenum*.

20 Los métodos de la invención pueden usarse para producir cualquiera de una variedad de alcoholes, que incluyen sin limitación etanol y/o butanol, por fermentación anaeróbica de ácidos en presencia de sustratos, particularmente sustratos gaseosos que contienen monóxido de carbono. Los métodos de la invención pueden aplicarse también a fermentaciones aeróbicas, a fermentaciones anaeróbicas o aeróbicas de otros productos, que incluyen aunque no están limitados a isopropanol, y la fermentación de sustratos distintos de gases que contienen carbono.

Figuras

25 Estos y otros aspectos de la presente invención, que deberían considerarse en todos sus nuevos aspectos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se da por medio de ejemplo solo, con referencia a las Figuras de acompañamiento, en que:

Figura 1:

30 Conversión de Butirato en Butanol por *C. autoethanogenum* en botellas de suero. Condiciones de partida: cultivo activo de *C. autoethanogenum*, que produce acetato (4,7 g/l) y etanol (1,2 g/l) pH 5,5, espacio de cabeza: sobrepresión de 273,693 kPa (25 psig) de 95% de CO en CO₂. Condiciones finales: pH 6,35, acetato (4,7 g/l), etanol (3,2 g/l), espacio de cabeza: sobrepresión de 197,851 kPa (14 psig).

Figura 2:

35 Efecto de la adición de formiato en un cultivo por cargas de *Clostridium autoethanogenum* que produce acetato y mínimo etanol. Se añadió disolución de formiato a t=0 y t=30 min (aprox.) después de forma continua a t=60 min (aprox.).

Figura 3:

40 Efecto de la adición de acetato en un cultivo continuo de *Clostridium autoethanogenum* que produce aproximadamente 6 g/L/día de etanol y 1 g/L/día de acetato. Se añadió acetato (15 g/L/día) de forma continua desde el día 52.

Figura 4:

45 Efecto del cambio de pH en un cultivo microbiano que comprende *Clostridium autoethanogenum* que produce acetato y etanol. El reciclado celular se inició durante aproximadamente 2 horas después que el pH se ajustara a 5,9 a aproximadamente t=3 días. Después del cambio de pH, el acetato se consumió y se produjeron cantidades crecientes de etanol.

Figura 5:

50 Un sistema que incluye un biorreactor de crecimiento y un biorreactor de conversión según las realizaciones particulares de la invención.

Figura 6:

Un sistema que incluye múltiples biorreactores de crecimiento y un biorreactor de conversión según las realizaciones particulares de la invención.

Realización(ones) de la invención

5 Lo siguiente es una descripción de la presente invención, que incluye varias realizaciones de la misma, dadas en términos generales. La invención se ejemplifica adicionalmente en la descripción dada bajo el encabezado "Ejemplos" a continuación en esta memoria, que proporciona datos experimentales que soportan la invención, ejemplos específicos de aspectos de la invención y medios ilustrativos de la realización de la invención.

10 Los productos que incluyen ácidos y alcoholes pueden producirse a partir de un sustrato que comprende CO mediante un cultivo microbiano. De acuerdo con los métodos de la invención, la perturbación del cultivo microbiano da por resultado sorprendentemente el consumo de ácidos con producción concomitante de alcoholes mediante el cultivo microbiano. Se considera que este resultado puede ser debido a al menos una porción del ácido presente en el caldo de fermentación que se reduce directa o indirectamente a alcohol, particularmente etanol. Esto puede denominarse como la "fase de conversión" de la reacción de fermentación. De acuerdo con los métodos de la invención, una reacción de fermentación puede cambiarse desde una fase de producción (o crecimiento), donde el crecimiento microbiano se promueve y los alcoholes y/o ácidos se producen, a la fase de conversión por perturbación del cultivo microbiano.

15 Se reconoce que al menos una parte del cultivo microbiano puede estar en una fase de producción mientras al menos una parte está en una fase de conversión. Sin embargo, en la perturbación, al menos una parte del cultivo microbiano en la fase de producción cambia a la fase de conversión, de manera que la producción de alcoholes respecto a ácidos aumenta. En una realización particular, hay un consumo neto total de ácido(s) y producción de alcohol(es).

20 De acuerdo con una realización de la invención, se produce etanol por fermentación microbiana cuando un cultivo microbiano que produce producto(s), tal como acetato y opcionalmente etanol, a partir de un sustrato que comprende CO se perturba. Al menos una parte del CO puede convertirse a ácidos y/o alcoholes después de la perturbación, aunque la mayoría del etanol se produce por reducción microbiana del ácido acético/acetato ("conversión").

25 Hay muchos ejemplos de reacciones de fermentación que usan sustratos que comprenden CO para producir alcoholes y/o ácidos, donde los alcoholes y ácidos se producen al mismo tiempo. Sin embargo, en dichos ejemplos, la relación de producto generalmente favorece al ácido (es decir, ácido acético/acetato) sobre el alcohol (etanol). En otra realización de la invención, las condiciones de fermentación particulares pueden favorecer la producción de alcohol sobre la producción de ácido. Bajo dichas condiciones, el ácido adicional añadido al fermentador puede convertirse al correspondiente alcohol mediante el cultivo microbiano. Por ejemplo, los ácidos tal como ácido butírico pueden añadirse a la reacción de fermentación y convertirse a alcoholes tal como butirato.

30 De acuerdo con los métodos de la invención, se ha encontrado sorprendentemente que no es necesario usar un mediador, tal como metil viológeno, para ayudar a la conversión de ácido(s) a alcohol(es). De hecho, se ha identificado que el metil viológeno, tiene un efecto negativo en la producción de butanol por *C. autoethanogenum*. Este está en contraste con informes de que se necesita un mediador para la conversión microbiana de ácidos a sus alcoholes correspondientes.

35 Aunque sin desear estar atado por cualquier teoría particular, se considera que la conversión de ácidos a alcoholes por *Clostridium autoethanogenum* de acuerdo con la invención se da por medio de una ruta bioquímica que implica la enzima aldehído oxidoreductasa (AOR). AOR es una única enzima que contiene tungsteno capaz de reducir ácidos carboxílicos no activados a aldehídos. El aldehído puede reducirse más por aldehído deshidrogenasas a alcohol. AOR representa una rama importante de la ruta de solventogénesis. El cofactor de tungsteno se ha mostrado que es crucial para la actividad enzimática. Estas enzimas pueden encontrarse en microorganismos fermentativos tales como *Clostridium*, *Desulfitobacterium* y *Pyrococcus*. Las AOR mejor caracterizadas pertenecen a *Pyrococcus furiosus* cuyo genoma contiene cinco de las cuales cuatro se han caracterizado. La primera AOR de *P. furiosus* tiene un amplio intervalo de sustratos aunque favorece a los aldehídos derivados de aminoácidos. Su estructura cristalina reveló la presencia de un sitio de unión a tungsteno basado en molibdopterina. La segunda AOR, gliceraldehído-3-fosfato ferredoxin oxidoreductasa (GFOR), solo utiliza gliceraldehídos-3-fosfato y la tercera AOR, formaldehído ferredoxin oxidoreductasa (FOR), prefiere aldehídos de uno a tres carbonos. La cuarta AOR, WOR5, tiene un amplio intervalo de sustratos. AOR también se han purificado de *Clostridium formicoaceticum* y *thermoaceticum*.

40 *Clostridium autoethanogenum* contiene dos genes AOR putativos que comparten el ~56% de identidad con AOR de *P. furiosus* y ~80% con *Clostridium botulinum*. Los genes de AOR marcan una diferencia significativa del pariente secuenciado más cercano de *C. autoethanogenum*, *Clostridium kluyveri*, cuyo genoma no contiene genes de AOR y la producción de alcohol sigue por medio de acetyl-CoA. Se contempla que los resultados obtenidos son aplicables a

la producción de cualquier alcohol a partir de su ácido correspondiente usando *Clostridium autoethanogenum* o cualquier otra bacteria capaz de usar la ruta de AOR.

5 Así, en su aspecto más amplio, la invención proporciona un método para convertir un ácido a su alcohol correspondiente usando un cultivo microbiano. En realizaciones particulares, el cultivo microbiano convierte el ácido al alcohol en presencia de un sustrato que comprende CO y/o H₂.

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, los siguientes términos como se usan a lo largo de esta memoria se definen como sigue:

10 Como se usa en esta memoria el término "fase de conversión" pretende referirse a un periodo de tiempo durante el que las bacterias están fermentando uno o más ácido(s) para producir uno o más alcohol(es). Típicamente al menos una parte de una población bacteriana estará en dicha fase. Sin embargo, no es necesario para todas las bacterias en una población estar produciendo alcohol de forma activa. La fase de conversión se caracteriza por la presencia de un nivel de alcohol en el caldo de fermentación.

15 El término "perturbar", "perturbación" y similares, como se usa en esta memoria en relación con un cultivo microbiano, se pretende que incluya cualquier alteración hecha que afecte directa o indirectamente al cultivo microbiano. Las alteraciones hechas al cultivo microbiano incluyen cambiar las condiciones de operación de fermentación tales como pH, concentración de CO, ORP o alterar la composición de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo.

20 El término "cultivo microbiano" y similares, como se usa en esta memoria se pretende que incluya al menos un microorganismo soportado en y/o sobre un medio nutriente adecuado para promover el crecimiento y/o producción de metabolito.

25 Como se menciona en esta memoria, el "alcohol producido" por un proceso de la invención no es un alcohol cuya una o más cepas de bacterias son capaces de producir cuando se hace crecer en el sustrato en ausencia del ácido correspondiente. Sin embargo, se apreciaría que los métodos pueden producir productos adicionales; por ejemplo, un ácido o alcohol que la bacterias fermentan del sustrato en que se cultiva. El "alcohol producido" por el método puede denominarse como el "alcohol principal" o "producto principal" y cualquier producto adicional como "co-productos". El uso de "principal" no debe tomarse como que implica un nivel particular de producto en comparación con los co-productos.

30 "Mediador(es) redox" y similares, como se usa en esta memoria pretende referirse a una lanzadera de electrones que actúa como un dador de electrones y/o aceptor de electrones reversible. Los mediadores incluyen tintes viológenos (tal como metil viológeno), antraquinona y otros tintes de quinona, tintes de trifenilmetano, ftalocianinas, tintes de metina, tintes de pirrol, tintes de porfirina, pteridinas, pteridonas, flavinas y complejos metálicos de grupos secundarios VI, VII y VIII.

35 El uso del término "ácido", "ácidos" y similar cuando se refieren a añadir un "ácido" a un cultivo o biorreactor de acuerdo con la invención debería tomarse de forma amplia, incluyendo cualquier ácido monocarboxílico y dicarboxílico. Además la referencia a adición de "ácido(s)" debería tomarse como que incluye la referencia a la sal equivalente o mezcla de sal y ácido. De forma similar, las referencias a ácidos específicos en esta memoria deberían tomarse como que incluye la referencia a sales equivalentes (por ejemplo, ácido butírico y butirato) y viceversa. La relación de ácido molecular a carboxilato en el caldo de fermentación es dependiente del pH del sistema. Ácidos ejemplares incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-pentanoico, ácido n-hexanoico y ácido benzoico.

El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o disposiciones de torres o tuberías, que incluye el Reactor de Tanque con Agitación Continua

45 (CSTR), Reactor de Célula Inmovilizada (ICR), Reactor de Lecho Irrigado (TBR), Columna de Burbujas, Fermentador de Bombeo Neumático, Reactor de Membrana tal como Biorreactor de Membrana de Fibra Hueca (HFMBR), Mezclador Estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido.

50 Como se describirá adicionalmente en esta memoria, en algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, cuando se refiere a la adición de uno o más carbohidratos al biorreactor o reacción de fermentación se entendería que incluye adición a cualquiera o ambos de estos reactores donde sea apropiado.

55 El término "sustratos que comprende monóxido de carbono" incluye cualquier material sólido, líquido o gaseoso que contiene CO que puede introducirse en un biorreactor para la fermentación. "Sustratos gaseosos que comprenden monóxido de carbono" incluyen cualquier gas que contenga monóxido de carbono. El sustrato gaseoso contendrá típicamente una proporción sustancial de CO, tal como, por ejemplo, al menos aproximadamente 15% a aproximadamente 95% de CO en volumen.

El término "concentración de CO disuelto" incluye la cantidad de CO presente en un caldo/medio de fermentación como una función de volumen.

El término "presión parcial de CO" y similares incluyen la presión relativa ejercida en un sistema por CO en un sustrato gaseoso que incluye CO y gases adicionales opcionales.

5 La frase "concentración umbral", "concentración umbral suficiente" y similares puede definirse cuantitativamente aunque pueden variar bajo diferentes condiciones de fermentación, tal como las empleadas con microbios diferentes; el término incluye la concentración o intervalo de concentración a la que un microbio cambia de producir esencialmente alcohol y/o ácido a partir de un sustrato, a producir alcohol y consumir ácido durante un periodo extenso.

10 A menos que el contexto necesite otra cosa, las frases "fermentar", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, como se usan en esta memoria, se pretende que abarquen tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto de un proceso que implica el crecimiento y/o biosíntesis de un producto mediante un microorganismo.

15 De acuerdo con los métodos de la invención, los productos que incluyen ácidos y alcoholes se producen a partir de un sustrato que comprende CO, por ejemplo, un sustrato gaseoso que comprende CO, por fermentación microbiana. En realizaciones particulares de la invención, un cultivo microbiano que crece activamente que produce productos tales como ácido(s) y opcionalmente alcohol(es) puede perturbarse de manera que al menos una parte del cultivo microbiano consume uno o más ácido(s) y produce uno o más alcohol(es) correspondiente(s). Este resultado puede ser debido a al menos una parte del ácido presente en el caldo de fermentación que se reduce directa o indirectamente a alcohol, particularmente etanol. Esto puede denominarse como la "fase de conversión" de la reacción de fermentación. De acuerdo con realizaciones particulares de la invención, una reacción de fermentación puede cambiarse de una fase esencialmente de producción, donde el crecimiento microbiano se promueve y los alcoholes y/o ácidos se producen, a la fase de conversión aumentando la concentración de CO en la reacción de fermentación.

25 En otras realizaciones de la invención, al menos una parte de un cultivo que crece activamente puede estar produciendo alcohol(es) y la perturbación incluye añadir uno o más ácido(s) al cultivo de manera que al menos una parte del uno o más ácido(s) se convierta(n) a uno o más alcohol(es).

Generalmente, los métodos de la invención comprenden al menos

30 (a) cultivar en un biorreactor una o más cepas de bacterias en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono para producir uno o más ácidos y opcionalmente uno o más alcoholes, y

(b) perturbar las bacterias cultivadas, de manera que al menos un ácido se convierte a al menos un alcohol.

35 En realizaciones particulares, al menos una parte del ácido producido por las bacterias durante la etapa (a) se convierte al alcohol correspondiente en la etapa (b). Sin embargo, en realizaciones particulares, puede(n) añadirse ácido(s) adicional(e)s al biorreactor, de manera que al menos una parte del(de los) ácido(s) añadido(s) se convierte(n) a alcohol(es) en la etapa (b). En dichas realizaciones, el alcohol producido puede no ser un alcohol que la una o más cepas de bacterias son capaces de producir cuando crecen en el sustrato en ausencia del ácido. El método se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de un mediador.

En una realización particular el método comprende al menos las etapa de

40 a) cultivar en un biorreactor una o más cepas de bacterias en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono, en donde las bacterias están produciendo alcohol(es); y

b) añadir ácido a las bacterias cultivadas cuando al menos una parte del cultivo está en una fase de conversión para producir alcohol.

45 Hay muchos ejemplos de reacciones de fermentación que usan sustratos que comprenden CO para producir alcoholes y/o ácidos, donde los alcoholes y ácidos se producen al mismo tiempo. Sin embargo, en dichos ejemplos, la relación de producto generalmente favorece al ácido (es decir, ácido acético/acetato) sobre el alcohol (etanol).

50 Perturbaciones adecuadas por cambiar un cultivo microbiano de una fase de producción a una fase de conversión incluyen aunque no están limitadas a: cambio de pH y/u ORP del medio de fermentación; cambio de concentración de CO en un caldo de fermentación (los expertos en la técnica apreciarán que hay múltiples métodos para alcanzar esto dependiendo del método de fermentación que incluye alterar la composición del gas, alterar la presión del gas, alterar el caudal de gas, alterar la velocidad de agitación en un CSTR); añadir agente reductor; añadir uno o más ácidos.

Por consiguiente, en realizaciones particulares de la invención, perturbar el cultivo microbiano incluye uno o más de:

- alterar el pH de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;

- alterar el ORP de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
 - añadir uno o más ácidos al biorreactor;
 - añadir uno o más agentes reductores al biorreactor;
 - alterar la concentración de CO en un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- 5 • alterar la presión parcial de CO en el biorreactor, en donde el sustrato que comprende CO es gaseoso.

Mientras la siguiente descripción se enfoca en realizaciones particulares de la invención, debería apreciarse que la invención es aplicable a la producción de alcoholes alternativos a partir de sus ácidos correspondientes. Alcoholes ilustrativos incluyen etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol y alcohol bencílico. Ácidos correspondientes ilustrativos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-pentanoico, ácido n-hexanoico y ácido benzoico, respectivamente. Ejemplos de alcoholes adicionales que pueden producirse de acuerdo con la invención incluyen aquellos de uso en las industrias del perfume, farmacéutica y de combustible.

Además, el método puede llevarse a cabo usando bacterias distintas de *C. autoethanogenum*; por ejemplo, especies bacterianas de los géneros Clostridia, Moorella, Eubacteria, Acetobacteria, Butyribacterium y Desulfobacterium pueden usarse. Más particularmente, pueden usarse *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicaceticum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Eubacterium limosum*, *Acetobacterium woodii*, *Butyribacterium methylotrophicum* y *Desulfobacterium autotrophicum*.

Ciertas realizaciones de la invención se adaptan para usar corrientes de gas producidas por uno o más procesos industriales. Dichos procesos incluyen procesos de fabricación de acero, particularmente procesos que producen una corriente de gas que tiene un alto contenido de CO o un contenido de CO por encima de un nivel predeterminado (es decir, 5%). Según dichas realizaciones, las bacterias carboxidotróficas se usan preferiblemente para producir ácidos y/o alcoholes, particularmente etanol o butanol, en uno o más biorreactores. Los expertos en la técnica serán conscientes en la consideración de la descripción actual que la invención puede aplicarse a diversas industrias o corrientes de gas residual, incluyendo los de vehículos con un motor de combustión interna. Además, los expertos en la técnica serán conscientes en la consideración de la descripción actual que la invención puede aplicarse a otras reacciones de fermentación que incluyen las que usan los mismos o diferentes microorganismos. Se pretende por lo tanto que el alcance de la invención no esté limitado a las realizaciones particulares y/o solicitudes descritas aunque se va a entender en vez de eso en un sentido más amplio; por ejemplo, la fuente de la corriente de gas no es limitante, aparte de eso al menos un componente de la misma es útil para alimentar la reacción de fermentación. La invención tiene aplicabilidad particular para mejorar la captura de carbono total y/o la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos tales como gases de escape de automóviles y gases de combustión industrial que contienen alto volumen de CO.

Fermentación

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

Un número de bacterias anaeróbicas se sabe que son capaces de llevar a cabo la fermentación de CO a alcoholes, incluyendo n-butanol y etanol, y ácidos tales como ácido acético, y son adecuadas para el uso en el proceso de la presente invención. Ejemplos de dichas bacterias que pueden ser adecuadas para el uso en la invención incluyen aquellas del género *Clostridium*, tal como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, que incluyen las descritas en los documentos WO 00/68407, EP 117309, patentes de EE.UU. núms. 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, WO 98/00558 y WO 02/08438, *Clostridium carboxydivorans* (Liou et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33: págs. 2085-2091), *Clostridium ragsdalei* (documento WO/2008/028055) y *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al, Archives of Microbiology 161: págs. 345-351). Otras bacterias adecuadas incluyen aquellas del género *Moorella*, que incluye *Moorella sp* HUC22-1, (Sakai et al, Biotechnology Letters 29: págs. 1607-1612), y aquellas del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G. et al (1991), Systematic and Applied Microbiology 14: 254-260). Ejemplos adicionales incluyen *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Ruminococcus productus*, *Acetobacterium woodii*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Oxobacter pfennigii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Simpa et. al. Critical Reviews in Biotechnology, 2006 Vol. 26. Págs. 41-65). Además, debería entenderse que otras bacterias anaeróbicas carboxidotróficas pueden ser aplicables a la presente invención como se entendería por un experto en la técnica. Se apreciara también que la invención puede aplicarse a un cultivo mixto de dos o más bacterias.

Un microorganismo ilustrativo adecuado para el uso en la presente invención es *Clostridium autoethanogenum*. En una realización, la *Clostridium autoethanogenum* es una *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificativas de la cepa depositada en el Centro de Recursos Alemán para Material Biológico (DSMZ) bajo el

número de depósito identificativo 19630. En otra realización, la *Clostridium autoethanogenum* es una *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificativas del número de depósito DSMZ de DSMZ 10061.

El cultivo de las bacterias usadas en los métodos de la invención puede llevarse a cabo usando cualquier número de procesos conocidos en la técnica para cultivar y fermentar sustratos usando bacterias anaeróbicas. Técnicas ilustrativas se proporcionan en la sección "Ejemplos" posterior. Por medio de ejemplo adicional, pueden utilizarse los procesos descritos generalmente en los siguientes artículos que usan sustratos gaseosos para la fermentación: (i) K. T. Klasson, et al. (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. *Conservation and Recycling*, 5; 145-165; (ii) K. T. Klasson, et al. (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel*. 70. 605-614; (iii) K. T. Klasson, et al. (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. *Enzyme and Microbial Technology*. 14, 602-608; (iv) J. L. Vega, et al. (1989). Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. *Biotech. Bioeng.* 34. 6. 785-793; (v) J. L. Vega, et al. (1989). Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 34. 6. 774-784; (vi) J. L. Vega, et al. (1990). Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. *Resources, Conservation and Recycling*. 3. 149-160.

La fermentación puede llevarse a cabo en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de tanque en agitación continua (CSTR), un reactor de célula inmovilizada, un reactor de bombeo neumático, un reactor de columna de burbujas (BCR), un reactor de membrana, tal como Biorreactor de Membrana de Fibra Hueca (HFMBR) o un reactor de lecho irrigado (TBR). Además, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en que los microorganismos se cultivan, y un segundo reactor de fermentación, al que el caldo de fermentación del reactor de crecimiento se alimenta y en que la mayoría del producto de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato) se produce.

En algunas realizaciones, donde el sustrato es gaseoso, puede ser deseable realizar la(s) fase(s) de producción y/o conversión a presión elevada; que puede ser al menos de varias atmósferas. Dichos sistemas emplearán el uso de un biorreactor adaptado para resistir presión elevada. Muchos tipos de biorreactores pueden adaptarse para resistir presiones elevadas; un ejemplo de dicho biorreactor es el reactor Buchi AUTOKLAV™.

En algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en que los microorganismos se cultivan y opcionalmente se producen ácidos, y un segundo reactor de fermentación, al que el caldo del reactor de crecimiento se alimenta y en que el adicional, si no la mayoría de, el producto de fermentación de alcohol (etanol, por ejemplo) se produce. Como se anota anteriormente, puede emplearse un biorreactor de fermentación valorado por presión.

Según varias realizaciones de la invención, la fuente de carbono para la reacción de fermentación es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como un subproducto de un proceso industrial, o de alguna otra fuente tal como de humos de escape de automóvil. En ciertas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de productos metálicos ferrosos, tal como una planta siderúrgica, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono, producción de amoniaco, producción de metanol y fabricación de coque. En estas realizaciones, el sustrato que contiene CO puede capturarse del proceso industrial antes de emitirse en la atmósfera, usando cualquier método conveniente. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO, puede ser deseable tratarlo para eliminar cualquier impureza indeseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo a la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o lavarse usando métodos conocidos.

De forma alternativa, el sustrato que contiene CO puede sacarse de la gasificación de biomasa. El proceso de gasificación implica combustión parcial de biomasa en un suministro restringido de aire u oxígeno. El gas resultante típicamente comprende principalmente CO y H₂, con volúmenes mínimos de CO₂, metano, etileno y etano. Por ejemplo, los subproductos de biomasa obtenidos durante la extracción y procesado de alimentos tales como azúcar de la caña de azúcar, o almidón del maíz o granos, o desecho de biomasa que no es alimento generado mediante la industria forestal puede gasificarse para producir un gas que contiene CO adecuado para el uso en la presente invención.

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

Mientras que no es necesario para el sustrato contener ningún hidrógeno, la presencia de H₂ no debería ser perjudicial para la formación de producto de acuerdo con métodos de la invención. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da por resultado una eficacia total mejorada de producción de alcohol. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el sustrato puede comprender una relación aproximada de 2:1, o 1:1, o 1:2 de H₂:CO. En

otras realizaciones, la corriente de sustrato comprende bajas concentraciones de H₂, por ejemplo, menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o está esencialmente libre de hidrógeno. El sustrato puede también contener algo de CO₂ por ejemplo, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO₂ en volumen, o 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen.

- 5 Típicamente, el monóxido de carbono se añadirá a la reacción de fermentación en un estado gaseoso. Sin embargo, los métodos de la invención no están limitados a la adición del sustrato en este estado. Por ejemplo, el monóxido de carbono puede proporcionarse en un líquido. Por ejemplo, un líquido puede estar saturado con un monóxido de carbono que contiene gas y ese líquido añadirse al biorreactor. Esto puede alcanzarse usando metodología estándar. Por medio del ejemplo un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. Scale-up of
10 microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volumen 101, Número 3 / Octubre, 2002) podrían usarse para este propósito.

En una realización de la invención, los productos se producen por fermentación de un primer sustrato y un segundo sustrato. En una realización particular de la invención, alcoholes y/o ácidos se producirán cuando un primer sustrato, tal como piruvato o un carbohidrato tal como fructosa o xilosa, y un segundo sustrato, tal como un sustrato que comprende CO, se proporcionen. Cuando la fermentación se perturba, al menos una parte de los ácidos (ácido acético/acetato) se convierten a alcoholes (etanol). Se apreciará en consideración de la presente descripción, que hay muchos ejemplos de carbohidratos adecuados para la fermentación conocida en la técnica y muchos ejemplos de los tipos de procesos usados para fermentar el sustrato de carbohidrato aplicable a los métodos de la invención. Por medio de ejemplo, los sustratos adecuados pueden incluir, aunque no están limitados a, monosacáridos tales como glucosa y fructosa, oligosacáridos tales como sacarosa o lactosa, polisacáridos, tales como celulosa o almidón. Aunque todos de estos sustratos de carbohidrato (y mezclas de los mismos) son adecuados para el uso en varias realizaciones de la presente invención, sustratos de carbohidrato que puede usarse más normalmente incluyen glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa (y mezclas de los mismos).

Los expertos en la técnica apreciarán desde consideración de estas descripciones que los azúcares fermentables adecuados para el uso en los presentes métodos pueden obtenerse a partir de biomasa celulósica y lignocelulósica a través de procesos de pre-tratamiento y sacarificación, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2007/0031918. La biomasa se refiere a cualquier material de celulosa o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa, y opcionalmente comprenden además hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa incluye, aunque no está limitada a cultivos de bioenergía, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, lodos de la fabricación de papel, residuos de jardín, residuos de madera y forestales.

En una realización de la invención, fructosa o xilosa comercialmente disponibles se usan como fuentes de carbono y energía opcionales para la fermentación.

Se apreciará que para que se dé el crecimiento de las bacterias y la fermentación de CO a producto, además del gas sustrato que contiene CO, necesitará alimentarse un medio nutriente líquido adecuado al biorreactor. Un medio nutriente contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo usado. Medios anaeróbicos adecuados para la fermentación de etanol usando CO como la única fuente de carbono se conocen en la técnica. Por ejemplo, medios adecuados se describen en las patentes de EE.UU. núms. 5.173.429 y 5.593.886 y documentos WO 02/08438, WO2007/115157 y WO2008/115080 referidas anteriormente. La presente invención proporciona unos medios nuevos que ha aumentado la eficacia en el soporte del crecimiento de los microorganismos y/o producción de alcohol en el proceso de fermentación. Estos medios se describirán en más detalle en adelante.

La fermentación se llevaría a cabo deseablemente bajo condiciones apropiadas para que ocurra la fermentación deseada (por ejemplo, CO a etanol). Las condiciones de reacción se considerarían incluyen presión, temperatura, caudal gaseoso, caudal líquido, pH de los medios, potencial redox de los medios, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado en continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato gaseoso para asegurar que el CO en la fase líquida no se vuelve limitante y concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición de producto. Las condiciones adecuadas se describen en los documentos WO02/08438, WO07/117157 y WO08/115080.

Las condiciones de reacción óptimas dependerán parcialmente en el microorganismo particular usado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se realice a presión mayor que la presión ambiente. Operando a presiones crecientes permite un aumento significativo en la velocidad de transferencia de CO de la fase gaseosa a la fase líquida donde puede dedicarse por el microorganismo como una fuente de carbono para la producción de etanol. Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen líquido en el biorreactor dividido por el caudal de gas de entrada) puede reducirse cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada más que a presión atmosférica.

Además, como una velocidad de conversión de CO a producto dada es en parte una función del tiempo de retención del sustrato, y alcanzar un tiempo de retención deseado a su vez dicta el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados pueden reducir en gran medida el volumen del biorreactor necesario, y por

consiguiente el coste de capital del equipo de fermentación. Según los ejemplos dados en la patente de EE.UU. núm. 5.593.886, el volumen del reactor puede reducirse en proporción lineal a los aumentos de presión de operación del reactor, es decir, los biorreactores operados a 10 atmósferas de presión necesitan solo ser una décima parte del volumen de los operados a 1 atmósfera de presión.

5 Los beneficios de realizar una fermentación de gas a etanol a presiones elevadas también se han descrito en otra parte. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones gas a etanol realizadas a presiones de 308,167 kPa (30 psig) y 618,431 kPa (75 psig), dando productividades de etanol de 150 g/l/día a 369 g/l/día respectivamente. Sin embargo, fermentaciones de ejemplo realizadas usando medios similares y composiciones de gas de entrada a presión atmosférica se encontraron que producen entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

También es deseable que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal como para asegurar que la concentración de CO en la fase líquida no se vuelva limitante. Esto es porque una consecuencia de condiciones limitadas por CO puede ser que el producto de etanol se consume por el cultivo.

15 En realizaciones particulares de la invención, el etanol se produce por fermentación microbiana cuando el sistema se perturba en recipientes cerrados. En varios ejemplos proporcionados en esta memoria, el pH de la fermentación está descontrolado y en la conversión del ácido a alcohol, el pH aumenta. En dichos ejemplos, el pH aumenta a alrededor de 6,5 y puede tener un efecto inhibitor en la conversión; los expertos en la técnica apreciarán que los métodos de la invención pueden incluir control de pH de los medios de fermentación.

Recuperación de producto

20 Una fermentación de acuerdo con los métodos de la invención dará por resultado un caldo de fermentación que comprende un producto deseable (tal como etanol y/o butanol) y/o uno o más subproductos (tal como acetato y butirato) además de células bacterianas, en un medio nutricional.

25 Los productos de la reacción de fermentación pueden recuperarse usando métodos conocidos. Los métodos ilustrativos incluyen los descritos en los documentos WO07/117157, WO08/115080, US 6.340.581, US 6.136.577, US 5.593.886, US 5.807.722 y US 5.821.111. Sin embargo, brevemente y por medio de ejemplo solo el etanol puede recuperarse del caldo de fermentación por métodos tales como destilación o evaporación fraccionada, y fermentación extractiva.

30 La destilación de etanol de un caldo de fermentación da una mezcla azeotrópica de etanol y agua (es decir, 95% de etanol y 5% de agua). El etanol anhídrido puede obtenerse posteriormente a través del uso de tecnología de deshidratación de etanol por criba molecular, que también es bien conocida en la técnica.

35 Los procedimientos de fermentación extractiva implican el uso de un disolvente miscible con agua que presenta un bajo riesgo de toxicidad para el organismo de fermentación, para recuperar el etanol del caldo de fermentación diluido. Por ejemplo, el alcohol de oleilo es un disolvente que puede usarse en este tipo de proceso de extracción. El alcohol de oleilo se introduce de forma continua en un fermentador, con lo cual este disolvente se eleva formando una capa en la parte superior del fermentador que se extrae de forma continua y se alimenta a través de una centrífuga. El agua y las células se separan entonces fácilmente del alcohol de oleilo y se devuelven al fermentador mientras el disolvente cargado de etanol se alimenta en una unidad de vaporización rápida. La mayoría del etanol se vaporiza y se condensa mientras el alcohol de oleilo no es volátil y se recupera para re-utilizar en la fermentación.

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

45 Por ejemplo, puede usarse un sistema de adsorción que implica un filtro de carbón activo. En este caso, se prefiere que las células microbianas se eliminen primero del caldo de fermentación usando una unidad de separación adecuada. Numerosos métodos basados en la filtración de generación de un caldo de fermentación libre de células para la recuperación de producto se conocen en la técnica. El permeado que contiene etanol libre de células - y acetato - se pasa entonces a través de una columna que contiene carbón activo para adsorber el acetato. El acetato en la forma de ácido (ácido acético) más que la forma salina (acetato) se adsorbe más fácilmente por carbón activo. Se prefiere por lo tanto que el pH del caldo de fermentación se reduzca a menos que aproximadamente 3 antes de pasarlo a través de la columna de carbón activo, para convertir la mayoría del acetato a la forma de ácido acético.

50 El ácido acético adsorbido al carbón activo puede recuperarse por elución usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse etanol para eluir el acetato unido. En ciertas realizaciones, el etanol producido por el proceso de fermentación en si mismo puede usarse para eluir el acetato. Porque el punto de ebullición del etanol es 78,8°C y el del ácido acético es 107°C, el etanol y el acetato pueden separarse fácilmente el uno del otro usando un método basado en la volatilidad tal como la destilación.

55 Otros métodos para recuperar acetato de un caldo de fermentación también se conocen en la técnica y pueden usarse en los procesos de la presente invención. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. núms. 6.368.819 y 6.753.170 describen un sistema de disolvente y co-disolvente que puede usarse para la extracción de ácido acético a partir de

caldos de fermentación. Como con el ejemplo del sistema basado en alcohol de oleilo descrito para la fermentación extractiva de etanol, los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. núms. 6.368.819 y 6.753.170 describen un disolvente/co-disolvente inmiscible en agua que pueden mezclarse con el caldo de fermentación tanto en presencia como en ausencia de los microorganismos fermentados para extraer el producto de ácido acético. El disolvente/co-disolvente que contiene el producto de ácido acético se separa entonces del caldo por destilación. Una segunda etapa de destilación puede usarse entonces para purificar el ácido acético del sistema de disolvente/co-disolvente.

Los productos de la reacción de fermentación (por ejemplo etanol y acetato) pueden recuperarse del caldo de fermentación eliminando de forma continua una parte del caldo del biorreactor de fermentación, separando células microbianas del caldo (convenientemente por filtración), y recuperando uno o más productos del caldo de forma simultánea o secuencial. En el caso de etanol puede recuperarse convenientemente por destilación, y el acetato puede recuperarse por adsorción en carbón activo, usando los métodos descritos anteriormente. Las células microbianas separadas se devuelven preferiblemente al biorreactor de fermentación. El permeado libre de células que permanece después de que el etanol y acetato se han eliminado se devuelve también preferiblemente al biorreactor de fermentación. Los nutrientes adicionales (tales como vitaminas B) pueden añadirse al permeado libre de células para reponer el medio nutriente antes de devolverlo al biorreactor. Además, si el pH del caldo se ajustó como se describe anteriormente para mejorar la adsorción de ácido acético al carbón activo, el pH debería reajustarse a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de devolverse al biorreactor.

La invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Conversión de ácido(s) a alcohol(es)

En un amplio aspecto particular, la invención proporciona un método para convertir ácido(s) a un(os) alcohol(es) correspondiente(s) usando un cultivo microbiano. En realizaciones particulares, el cultivo microbiano convierte el ácido al alcohol en presencia de un sustrato que comprende CO y/o H₂.

De acuerdo con los métodos de la invención, un cultivo microbiano que comprende una o más bacterias carboxidotróficas puede perturbarse de manera que el cultivo microbiano convierte ácido(s) a alcohol(es). Los métodos de la invención son aplicables a un intervalo de reacciones de fermentación microbiana que utilizan CO como un sustrato principal y producen uno o más ácidos y/o alcoholes. Por ejemplo, las fermentaciones para producir acetato, butirato, propionato, caproato, etanol, propanol y butanol pueden llevarse a cabo de acuerdo con los métodos de la invención. Los métodos de la invención pueden usarse también en la producción de hidrógeno. Estos productos pueden producirse, por ejemplo, por fermentación usando microbios carboxidotróficos del género *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*/*Peprostreprococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Meihanosarcina* y *Desulfotomaculum*.

En realizaciones particulares, el cultivo microbiano comprende bacterias acetogénicas, tales como *Clostridium autoethanogenum* que utilizan típicamente un sustrato que comprende CO para producir productos que incluyen acetato y/o etanol. En dichas realizaciones, el cultivo microbiano puede hacerse crecer bajo condiciones deseables en un caldo de fermentación para promover el crecimiento y producción de acetato. La fase de crecimiento (o producción) de bacterias acetogénicas se asocia típicamente con un aumento en materia celular (acumulación de biomasa) y producción de acetato, con poca o ninguna producción de alcohol concomitante. En realizaciones particulares de la invención, el cultivo microbiano se perturba de manera que los ácidos presentes en el caldo de fermentación se convierten a alcoholes correspondientes (por ejemplo, acetato a etanol y/o butirato a butanol). La conversión de ácidos a alcoholes puede denominarse como la fase de conversión.

En realizaciones particulares de la invención, el cultivo microbiano puede perturbarse de manera que los ácidos producidos por el cultivo durante la fase de producción se convierten a alcoholes. Adicional o alternativamente, el cultivo microbiano puede perturbarse de manera que los ácidos no producidos por el cultivo durante la fase de producción se convierten a alcoholes. Por ejemplo, alcoholes no producidos por el cultivo microbiano (tal como propionato, butirato, valerato, hexanoato, isovalerato, 2-metilbutirato) pueden añadirse al caldo de fermentación y convertirse a los alcoholes correspondientes.

En una realización de la invención el ácido se alimenta primero o se añade a la reacción de fermentación antes o durante la etapa de conversión. El ácido puede añadirse opcionalmente en carga única o múltiples cargas o de forma continua durante un periodo de tiempo deseado. La cantidad de ácido añadido al biorreactor puede variar. Sin embargo, los inventores contemplan la adición de ácido en una cantidad que proporciona una concentración de aproximadamente 0,1 a 100 g de ácido por L de caldo de fermentación. Más preferiblemente, el ácido se añade en una cantidad para proporcionar una concentración de aproximadamente 0,1 a 50 g/L o 1 a 20 g/L. Ejemplos adicionales de niveles apropiados de ácido a añadir a un cultivo bacteriano se proporcionan en la sección de "Ejemplos" en esta memoria más adelante.

El ácido puede añadirse al biorreactor en una carga, carga de alimentación, o manera continua. En una realización el ácido se añade en una carga de alimentación o manera continua de manera que mantenga una concentración de ácido en el biorreactor en el intervalo mencionado anteriormente.

El ácido puede añadirse al biorreactor en cualquier forma adecuada, incluyendo composiciones que contienen el ácido y uno o más ingredientes, vehículos o diluyentes distintos. En una realización, el ácido se prepara preferiblemente y se añade al biorreactor como una disolución madre, tamponada a pH 5,5.

5 Los ácidos de uso en la invención pueden producirse por cualquier número de métodos conocidos, incluyendo fermentación microbiana. En una realización, los ácidos se producen por fermentación microbiana en sustratos que comprenden carbohidratos o monóxido de carbono por ejemplo. Preferiblemente se producen por fermentación microbiana en un sustrato que comprende monóxido de carbono, más preferiblemente un sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono. Ejemplos de bacterias de uso en la producción de los ácidos incluyen los de los géneros Clostridia, Moorella y Ruminococcus, Eubacteria, Butyribacterium, Oxobacter y Acetobacteria son de uso para este fin. En realizaciones preferidas las bacterias se eligen de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium*
10 *Ijungdahlii*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicaceticum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Ruminococcus productus*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Oxobacter pfennigii* y *Acetobacterium woodii*. Los expertos pueden apreciar fácilmente bacterias adicionales de uso en la producción de ácidos aplicables a la presente invención.

15 Los procesos para la fermentación microbiana para producir ácidos de uso en la invención se apreciarán fácilmente por expertos en la técnica, particularmente que tienen consideración a la información proporcionada en esta memoria. Sin embargo, por medio del ejemplo, el butirato puede producirse a partir de gases que contienen monóxido de carbono como se describe por Grethlein et al, 1991 (Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 72, Núm. 1, 58-60).

20 En una realización de la invención el método es un proceso de alimentación por cargas o continuo que une la producción de un ácido deseado por fermentación microbiana seguido por el uso de ese ácido para producir su alcohol correspondiente de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria anteriormente. En esta realización, el método comprende al menos las etapas de a) en un primer biorreactor fermentar un sustrato (preferiblemente un sustrato que comprende monóxido de carbono, más preferiblemente un sustrato gaseoso que comprende monóxido
25 de carbono) para producir uno o más ácidos, b) en un segundo biorreactor cultivar una o más cepas de bacterias en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono, y c) introducir el uno o más ácidos de (a) en el segundo biorreactor en un momento cuando la una o más cepas de bacterias están en una fase de conversión para producir los alcoholes correspondientes al uno o más ácidos. En una realización relacionada los reactores de crecimiento adicionales pueden alimentar bacterias al primer y/o segundo biorreactor.

30 Mientras en realizaciones particulares las bacterias se cultivan en presencia de un sustrato que comprende monóxido de carbono, en realizaciones alternativas las bacterias pueden primero hacerse crecer a una densidad deseada en un sustrato alternativo, por ejemplo, uno que comprende azúcares u otros carbohidratos. Las bacterias pueden transferirse entonces a un sustrato que comprende monóxido de carbono para la conversión de ácidos a sus alcoholes correspondientes. Esta realización puede realizarse en un sistema de dos reactores como se describe anteriormente.
35

Las reacciones de fermentación que utilizan un sustrato mixto, tal como carbohidrato y un sustrato gaseoso que comprende CO pueden usarse para producir alcoholes y/o ácidos. De acuerdo con los métodos de la invención, en la perturbación de dichas reacciones de fermentación, al menos una parte del ácido se consume, y la producción de alcohol aumenta.

40 De acuerdo con los métodos de la invención, los alcoholes y/o ácidos pueden producirse por fermentación microbiana de un sustrato alternativo tal como carbohidratos. A un punto temporal predeterminado, o en acumulación de una cantidad en exceso de ácido, CO puede añadirse al biorreactor y la reacción de fermentación opcionalmente perturbarse adicionalmente para convertir al menos una parte del ácido a alcohol.

45 Se apreciará que para soportar el crecimiento y la conversión por bacterias de uso en la invención, un medio nutriente adecuado necesitará alimentarse al biorreactor. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente medios de uso en la presente invención. Sin embargo, generalmente, un medio nutriente contendrá vitaminas, minerales y metales suficientes para permitir el crecimiento de las bacterias en sustratos que comprenden CO. En particular los medios incluirán uno o más metales que ayudan a la actividad de enzimas que pueden estar implicados en la conversión de ácidos a sus alcoholes correspondientes; por ejemplo, CODH (CO-deshidrogenasa) y enzimas AOR.
50 En una realización de la invención, el medio nutriente no contiene triptona ni extracto de levadura. Los medios anaeróbicos adecuados para usar en la presente invención incluyen la formulación de medios LM23 y LM33 descritos en esta memoria a continuación bajo la sección encabezada "ejemplos" a continuación en esta memoria.

Mientras un único tipo de medios puede usarse para soportar el crecimiento y la formación de producto, se apreciaría que más de un medio puede usarse en un proceso de la invención. Por ejemplo, donde el proceso utiliza reactores separados de crecimiento y fermentación, un medio puede utilizarse en el reactor de crecimiento y medios separados en el reactor de fermentación.
55

El cultivo de las bacterias se llevaría a cabo deseablemente bajo condiciones apropiadas para permitir que ocurra la conversión de ácidos a alcoholes. Las condiciones de reacción que se considerarían incluyen presión, temperatura,

caudal gaseoso, caudal líquido, pH del medio, potencial redox de los medios, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado en continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato gaseoso para asegurar que el CO en la fase líquida no se vuelve limitante, y concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición de producto. Condiciones ilustrativas se proporcionan en la sección de "ejemplos" a continuación en esta memoria. Las condiciones óptimas de reacción dependerán parcialmente de las bacterias a usar y el alcohol a producir.

También es deseable que la velocidad de introducción del sustrato que contiene CO sea tal como para asegurar que la concentración de CO en la fase líquida no se vuelva limitante. Esto es porque una consecuencia de condiciones limitadas por CO pueden ser que el(los) producto(s) se consuma(n) por el cultivo.

Se apreciará por personas de conocimiento general en consideración de la descripción actual que una variedad de condiciones o parámetros de fermentación pueden alterarse para perturbar el cultivo microbiano de manera que al menos una parte del cultivo microbiano se cambie de una fase de producción a una fase de conversión. Por ejemplo, un parámetro de fermentación puede alterarse de manera que los ácidos se convierten a alcoholes mediante el cultivo microbiano. Perturbaciones adecuadas por cambiar un cultivo microbiano de una fase de producción a una fase de conversión incluyen: cambio de pH y/u ORP de un medio de fermentación; cambio de concentración de CO en un caldo de fermentación (hay múltiples métodos para alcanzar esto dependiendo del método de fermentación que incluye alterar la composición del gas, alterar la presión del gas, alterar el caudal de gas, alterar la velocidad de agitación en un CSTR); añadir agente reductor; añadir uno o más ácidos. Los expertos en la técnica apreciarán métodos adecuados para alcanzar la perturbación deseada y apreciarán también métodos adicionales para perturbar un cultivo microbiano de acuerdo con los métodos de la invención. Sin embargo, varios métodos ilustrativos se describen en la sección "Ejemplos" más adelante. En realizaciones particulares de la invención, añadir uno o más ácidos al caldo de fermentación proporciona perturbación adecuada para al menos cambiar una parte del cultivo microbiano de una fase de producción a una fase de conversión. Por ejemplo, puede añadirse acetato a un cultivo microbiano que crece de forma activa y que produce acetato y alcoholes y el cultivo convierte al menos una parte del acetato añadido en etanol.

En una realización de la invención, puede añadirse acetato adicional a una reacción de fermentación produciendo de forma continua alcohol y acetato a una velocidad de aproximadamente 15 g/L/día. Por consiguiente, el cultivo convertirá el acetato a etanol a una velocidad de 6-15 g/L/día.

En una realización alternativa, pueden añadirse ácidos adicionales en conjunto con al menos una perturbación diferente tal como alterar la concentración de CO en el caldo de fermentación o añadir un agente reductor.

Cualquier agente reductor adecuado puede usarse de acuerdo con los métodos de la invención, sin embargo por medio del ejemplo, pueden añadirse sales de ditionita (tal como ditionita sódica), sales de sulfuro (tal como sulfuro sódico) o cisteína y opcionalmente ácido(s) adicionales a una reacción de fermentación de manera que al menos una parte del cultivo microbiano cambia de una fase de producción a una fase de conversión, convirtiendo así ácido(s) a alcohol(es) correspondientes. En realizaciones particulares el sulfuro sódico se añade a una reacción de fermentación que produce predominantemente acetato, de manera que al menos una parte del acetato se convierte en etanol. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar la cantidad de agente reductor necesario para perturbar el sistema suficientemente para convertir ácidos a alcoholes. Sin embargo, por medio del ejemplo los agentes reductores pueden añadirse en el intervalo de concentración de 0,005 mM a 10 mM o 0,05 mM a 1 mM. En realizaciones particulares de la invención un mediador redox tal como metil viológeno se añade además del agente reductor. La adición del mediador redox tiene un efecto perjudicial, así de acuerdo con realizaciones particulares de la invención, el método para convertir ácido(s) a alcohol(es) se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de un mediador redox.

En otra realización de la invención, se añade formiato a una reacción de fermentación para cambiar el cultivo microbiano de la fase de producción a la fase de conversión. En realizaciones particulares de la invención, 2-5 g/L de formiato pueden añadirse al cultivo microbiano de manera que el acetato producido por el cultivo durante la fase de producción se convierte en etanol. En realizaciones particulares, el formiato puede añadirse a una velocidad de aproximadamente 3-6 g/L/día de manera que al menos una parte del acetato producido por el cultivo se convierte en etanol.

En otra realización de la invención, el cultivo microbiano puede perturbarse alterando el pH y/u ORP (potencial redox abierto) de unos medios de fermentación que contienen un cultivo microbiano, de manera que el(los) ácido(s) se convierte(n) en alcohol(es). Los expertos en la técnica apreciarán medios y/o métodos para alterar el pH y/u ORP de unos medios de fermentación. Sin embargo por medio del ejemplo, el pH de un medio nutriente líquido que contiene un cultivo microbiano puede ajustarse usando ácidos (tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido acético) o bases (tal como hidróxido sódico). De forma similar, ORP puede ajustarse en combinación con pH o independientemente mediante adición de agentes reductores.

En una realización particular, el pH de un medio nutriente líquido mantenido a pH 5,5 se aumenta a 5,9 por adición de hidróxido sódico de manera que el acetato producido durante una fase de producción se convierte en etanol. En el cambio de pH, el potencial redox de los medios se reduce de aproximadamente -430 a -470 mV.

- En otra realización de la invención, aumentar la concentración de CO en un biorreactor cambia al menos una parte del cultivo microbiano de una fase de producción a una fase de conversión. En ciertas realizaciones, un cultivo microbiano se establece en un medio nutriente líquido en un biorreactor agitado tal como un CSTR. Se reconoce que debido a la baja solubilidad del CO, a alta densidad celular (por ejemplo 0,5 - 5 g/L) la concentración de CO en el medio nutriente líquido se aproximará a cero mientras el cultivo microbiano consume el CO a aproximadamente la misma velocidad que se transfiere a la disolución. La concentración de CO del medio nutriente líquido puede aumentarse aumentando la presión parcial de CO según la ley de Henry. Así, de acuerdo con realizaciones particulares de la invención, el cultivo microbiano se perturba aumentando la presión parcial de CO en un biorreactor.
- De acuerdo con una realización de la invención, se produce etanol por fermentación microbiana cuando la concentración de CO en los medios de fermentación se aumenta. Al menos una parte del CO puede convertirse a ácidos y/o alcoholes durante esta fase de conversión, aunque la mayoría del etanol puede producirse por reducción microbiana del ácido acético/acetato. Se reconoce que algunas reacciones de fermentación pueden operarse a presión parcial de CO elevada. Como tal, para aumentar la concentración de CO en los medios de fermentación, la presión parcial de CO puede aumentarse en al menos 103,421 kPa (15 psi), o al menos 137,895 kPa (20 psi), o al menos 172,368 kPa (25 psi), o al menos 206,842 kPa (30 psi), o al menos 241,316 kPa (35 psi), o al menos 275,790 kPa (40 psi) de manera que el(los) ácido(s) se convierte(n) a alcohol(es).
- En una realización de la invención, una parte sustancial del ácido en un caldo de fermentación se convierte a alcohol. En algunas realizaciones de la invención, el aumento de la concentración de CO da por resultado que al menos el 60% del ácido disponible en el caldo de fermentación se convierta en alcohol. En otras realizaciones, al menos el 70% del ácido se convierte a alcohol. En otras realizaciones, al menos el 80% del ácido se convierte a alcohol.
- En realizaciones particulares de la invención, la presión parcial de CO se aumenta a aproximadamente 109,626 kPa (15,9 psia), o al menos 137,895 kPa (20 psia), o al menos 206,842 kPa (30 psia), o al menos 275,790 kPa (40 psia), o al menos 344,737 kPa (50 psia) de manera que los ácidos se convierten a los alcoholes correspondientes. En dichas realizaciones, según la ley de Henry, la concentración de CO en el medio nutriente líquido se espera que sea al menos 1 mmol, o al menos 1,2 mmoles, o al menos 1,4 mmoles, o al menos 1,6 mmoles, o al menos 1,8 mmoles, o al menos 2,2 mmoles o al menos 2,6 mmoles o al menos 3,2 mmoles.
- En ciertas realizaciones de la invención, los ácidos se convierten a los alcoholes correspondientes a una velocidad de aproximadamente al menos 12 g/L/día, o al menos 14 g/L/día, o al menos 16 g/L/día, o al menos 18 g/L/día, o al menos 20 g/L/día, o al menos 22 g/L/día, o al menos 24 g/L/día en el periodo posterior a la perturbación (por ejemplo, hasta 1 hora, o hasta 2 h, o hasta 3 h, o hasta 5 h después de la perturbación). En realizaciones particulares, en presencia de hidrógeno además de CO, la velocidad de conversión de ácido a alcohol aumenta hasta 25 g/L/día, o hasta 26 g/L/día, o hasta 27 g/L/día después de la perturbación. Sin embargo, la velocidad de conversión se ralentiza con el tiempo, de manera que en ciertas realizaciones el(los) ácido(s) (por ejemplo, acetato) pueden continuar acumulándose durante el curso de la reacción de fermentación.
- Aumentando la concentración (o presión parcial) de CO de acuerdo con los métodos de la invención promueve la producción de ácido y el crecimiento microbiano. Sin embargo, cuando la concentración de CO (o presión parcial) se aumenta por encima de una concentración umbral suficiente, la producción de ácido y/o crecimiento microbiano se inhibe sustancialmente. Por consiguiente, de acuerdo con los métodos de la invención, el crecimiento microbiano y/o producción de ácido puede regularse añadiendo CO. Así, la invención proporciona un medio para controlar la producción de productos que incluyen alcoholes y/o ácidos mediante fermentación microbiana de CO, en donde, en la acumulación de un exceso de ácido en un caldo de fermentación, la concentración de CO puede aumentarse por encima de una concentración umbral para convertir al menos una parte del ácido a alcohol.
- En una realización, la invención proporciona un método para producir alcoholes desde la fermentación bacteriana anaeróbica de un ácido. En una realización, el método comprende al menos la etapa de fermentar de forma anaeróbica un ácido en presencia de un sustrato que comprende CO, preferiblemente un sustrato gaseoso que comprende CO, en donde la concentración de CO está por encima de una concentración umbral suficiente.
- En una realización de la invención, se produce etanol por fermentación microbiana de ácido acético/acetato, cuando la concentración de CO en los medios de fermentación está por encima de una concentración umbral suficiente. En una realización, un sustrato que comprende CO se proporciona de manera que la concentración de CO en unos medios de fermentación está por encima de una concentración umbral de al menos aproximadamente 2,5 mmoles/L. En otras realizaciones, la concentración de CO está por encima de un umbral de al menos aproximadamente 2,75 mmoles/L, al menos aproximadamente 3 mmoles/L o al menos aproximadamente 3,5 mmoles/L.
- En una realización de la invención, el sustrato que comprende CO es gaseoso y el sustrato gaseoso se proporciona de manera que el CO tiene una presión parcial al menos aproximadamente 255,106 kPa (37 psi). En una realización, la presión parcial de CO es al menos aproximadamente 324,053 kPa (47 psi).

- En otra realización, se proporciona un método para producir alcoholes y/o ácidos, incluyendo el método fermentar de forma anaeróbica un primer sustrato en un biorreactor para producir uno o más productos que incluyen alcoholes y/o ácidos; en donde un segundo sustrato que comprende CO puede añadirse a un punto temporal deseado de manera que la producción de etanol respecto a acetato aumenta. El segundo sustrato que comprende CO se proporciona de manera que la concentración de CO excede una concentración umbral suficiente. Bajo dichas condiciones, la producción de alcohol aumenta mientras el ácido se consume y el CO puede estar esencialmente no convertido.
- En una realización de la invención, el primer sustrato contiene CO; sin embargo, el método no está limitado a dicha realización. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, el primer sustrato puede incluir piruvato o uno o más carbohidratos. El uno o más carbohidratos puede ser, por ejemplo y sin limitación, celulosa, hidrolisato de celulosa, almidón, hidrolisato de almidón, glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa o lactosa. En una realización, el carbohidrato es fructosa o xilosa. De forma alternativa, el primer sustrato puede comprender CO₂ y/o H₂ o cualquier otro componente adecuado para producir ácidos y/o alcoholes por fermentación.
- En una realización adicional de la invención, se proporciona un método para producir alcoholes y/o ácidos, incluyendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar un sustrato que comprende CO a una primera concentración en un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos; y
- (b) fermentar de forma anaeróbica el cultivo para producir uno o más productos que incluyen alcoholes y/o ácidos de dicho sustrato,
- en donde la concentración del sustrato proporcionado al biorreactor puede aumentarse opcionalmente a un punto temporal deseado, de manera que la producción de alcoholes respecto a ácidos aumenta.
- En una realización, el sustrato se proporciona en (a) de manera que la concentración de CO en los medios de fermentación está por debajo de una concentración umbral suficiente. En dicho momento que la concentración de CO se aumenta, el sustrato puede proporcionarse de manera que la concentración de CO está por encima de una concentración umbral suficiente.
- En una realización adicional de la invención, el método incluye al menos las etapas de:
- (a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a una primera presión parcial de CO en un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos; y
- (b) fermentar de forma anaeróbica el cultivo para producir uno o más productos que incluyen etanol y/o ácido acético de dicho sustrato,
- en donde la presión parcial de CO puede aumentarse opcionalmente a un punto temporal deseado de manera que la producción de etanol respecto a acetato aumenta.
- En realizaciones particulares, la producción del alcohol y el ácido y/o crecimiento microbiano se monitoriza a lo largo del proceso de fermentación. Bajo dichas condiciones, la fermentación puede cambiarse fácilmente entre la producción sustancial de ácido a la producción sustancial de alcohol, como se necesita o desea. En varias realizaciones, las etapas (c) y (d) pueden repetirse a lo largo del proceso de fermentación para mantener las condiciones óptimas para la producción de alcohol.
- Los gases residuales industriales que comprenden CO, tal como el gas residual que forma una planta siderúrgica puede usarse para convertir ácido(s) a alcohol(es) de acuerdo con los métodos de la invención. Además, los gases libres de CO que comprenden H₂ pueden usarse también para convertir ácido(s) a alcohol(es) de acuerdo con los métodos de la invención.
- La invención también proporciona unos medios para alternar entre una fase de producción y una fase de conversión cambiando las concentraciones de CO para cambiar de la fase de producción a la fase de conversión y vuelta. Por ejemplo, y como se muestra en los ejemplos, aumentar la concentración de CO por encima de una concentración umbral da por resultado que una parte sustancial de ácido acético disponible en un caldo de fermentación se consume con un aumento concomitante en la producción de etanol. La reducción de la concentración de CO por debajo de la concentración umbral puede promover el crecimiento microbiano y la producción de ácido como se observa en la fase de producción. Por ejemplo, una reacción de fermentación particular puede operar a una presión parcial de CO deseable y producir productos que incluyen ácido(s). A un punto temporal adecuado, o una concentración de ácido particular (tal como hasta 20 g/L, o hasta 30 g/L, o hasta 40 g/L o hasta 50 g/L), el cultivo microbiano puede perturbarse de manera que el(los) ácido(s) se convierte(n) a alcohol. De acuerdo con los métodos de la invención, la presión parcial de CO puede aumentarse en al menos 103,421 kPa (15 psi), o al menos 137,895 kPa (20 psi), o al menos 172,368 kPa (25 psi), o al menos 206,842 kPa (30 psi), o al menos 241,316 kPa (35 psi), o al menos 275,790 kPa (40 psi) de manera que el(los) ácido(s) se convierte(n) a alcohol(es). Después de la conversión, la presión parcial puede reducirse en al menos 103,421 kPa (15 psi), o al menos 137,895 kPa (20 psi), o al menos 172,368 kPa (25 psi), o al menos 206,842 kPa (30 psi), o al menos 241,316 kPa (35 psi), o al menos

275,790 kPa (40 psi), de manera que la producción de acetato continua. Este proceso puede repetirse para evitar la acumulación de acetato y aumentar la concentración de alcohol.

5 En realizaciones alternativas, el cultivo microbiano puede convertir ácido(s) a alcohol(es) durante hasta 1h, o hasta 2h, o hasta 3h, o hasta 5h después de la perturbación. Posteriormente, como el cultivo se ajusta a la presión parcial de CO elevada y/o consume CO de manera que la concentración de CO disminuye, el cultivo cambiará de nuevo a producción de ácido.

Se contempla que durante varios ciclos, los niveles de alcohol aumentarán mientras los niveles de ácido permanecen a baja concentración, tal como por debajo de 20 g/L, o por debajo de 30 g/L, o por debajo de 40 g/L, o por debajo de 50 g/L).

10 Sistema de dos (o más) biorreactores

15 En algunas realizaciones de la invención, las reacciones de fermentación pueden llevarse a cabo en dos o más etapas en un sistema que puede comprender un reactor de crecimiento (o producción) en que los microorganismos se cultivan y opcionalmente se producen ácidos, y un reactor de conversión, al que se alimenta el caldo del reactor de crecimiento y se aplica una perturbación de manera que los ácidos producidos o añadidos se convierten a alcoholes. Como se anota anteriormente, puede emplearse un biorreactor de fermentación valorado por presión.

20 En referencia a la Figura 5, el sistema de fermentación 100 comprende un biorreactor de crecimiento 1, donde las condiciones de fermentación pueden adaptarse para promover la acumulación o crecimiento de biomasa microbiana y/o producción de ácido. Por ejemplo, condiciones tales como componentes de medios nutrientes líquidos, velocidad de alimentación de nutrientes, presión de operación, pH de operación, contenido y concentración de sustratos, velocidad de alimentación de sustrato, velocidad de agitación del fermentador (si es aplicable) y densidad celular pueden adaptarse para promover el crecimiento microbiano y/o producción de ácido. Condiciones ilustrativas para proporcionar biomasa microbiana en estado estacionario y producción de ácido se proporcionan en la sección de "Ejemplos" posterior.

25 El sustrato proporcionado al biorreactor de crecimiento 1 puede seleccionarse de los descritos anteriormente, sin embargo, en realizaciones particulares el sustrato es carbohidrato o CO, o es una combinación de carbohidrato y CO.

30 El medio nutriente líquido puede retenerse esencialmente en el biorreactor de crecimiento 1 durante un tiempo tal que la biomasa microbiana y/o ácidos alcancen niveles deseados y/o velocidades de producción deseadas. La biomasa microbiana y/o producción de ácido en el biorreactor de crecimiento puede monitorizarse de forma rutinaria o continua por medios conocidos en la técnica. Además, las condiciones en el biorreactor de crecimiento pueden ajustarse para mantener condiciones esencialmente óptimas para el crecimiento y/o producción de ácido.

Se apreciará por los expertos en la técnica que el alcohol puede también producirse bajo ciertas condiciones en el biorreactor de crecimiento. Sin embargo, en realizaciones particulares, el(los) ácido(s) será(n) el producto principal en el biorreactor de crecimiento.

35 En el momento cuando se han obtenido los niveles o velocidades de biomasa y/o ácido deseados, al menos una parte del ácido y opcionalmente al menos una parte de la biomasa microbiana puede pasarse, por medios de conducción adecuados, del reactor de crecimiento 1 al reactor de conversión 2, de forma continua o en puntos temporales deseados. Por ejemplo a una concentración de ácido deseada en el biorreactor de crecimiento 1, tal como al menos 5 g/L, o al menos 10 g/L, o al menos 20 g/L, o al menos 30 g/L, o al menos 40 g/L, o al menos 50 g/L, o al menos 60 g/L, o al menos 70 g/L, o al menos 80 g/L, o al menos 90 g/L o al menos 100 g/L, una parte del medio nutriente líquido que comprende dichos ácidos y opcionalmente biomasa microbiana pueden pasarse al biorreactor de conversión 2, en donde un cultivo microbiano puede perturbarse de manera que los ácidos se convierten a alcoholes.

45 El medio nutriente líquido que sale del biorreactor de crecimiento 1 se sustituirá típicamente con medio nutriente líquido fresco para proporcionar condiciones adecuadas para la producción de biomasa y/o ácido en estado estacionario. La concentración de ácido en el biorreactor de crecimiento 1 se mantendría por debajo de un nivel al que se da la inhibición del microbio particular.

50 En realizaciones particulares de la invención, un sustrato que comprende CO se proporciona al biorreactor de conversión 2 de manera que la concentración de CO en el medio nutriente líquido es al menos aproximadamente 2,5 mmoles/L o al menos aproximadamente 2,75 mmoles/L o al menos aproximadamente 3 mmoles/L, o al menos aproximadamente 3,5 mmoles/L. En realizaciones particulares, el sustrato que comprende CO es gaseoso y puede proporcionarse de manera que la presión parcial de CO es al menos aproximadamente 186,158 kPa (27 psi), o al menos aproximadamente 255,106 kPa (37 psi) o al menos aproximadamente 324,053 kPa (47 psi).

55 El consumo de ácido y/o producción de alcohol en el biorreactor de conversión 2 puede monitorizarse de forma rutinaria o continua por medios conocidos en la técnica. En el momento cuando el medio nutriente líquido alcanza una concentración de alcohol deseada, tal como al menos 5 g/L, o al menos 10 g/L, o al menos 20 g/L, o al menos

30 g/L, o al menos 40 g/L, o al menos 50 g/L, o al menos 60 g/L, o al menos 70 g/L, o al menos 80 g/L, o al menos 90 g/L o al menos 100 g/L, una parte del medio nutriente líquido que comprende dichos alcoholes pueden pasarse a un aparato de recuperación de producto 3. La concentración de alcohol en el biorreactor de conversión debería mantenerse por debajo de un nivel al que se dé la inhibición del cultivo microbiano usado para la producción de alcohol.

En una realización de la invención, el microbio cultivado y hecho crecer en el biorreactor de crecimiento 1 es un microbio carboxidotrófico tal como los descritos anteriormente, y las condiciones se optimizan para el crecimiento microbiano y/o producción de ácido. Un segundo microbio (también un microbio carboxidotrófico) puede proporcionarse al biorreactor de conversión 2 y las condiciones optimizarse para la producción de alcohol. El cultivo microbiano proporcionado en los biorreactores de crecimiento y conversión pueden ser iguales o diferentes. Sin embargo, en una realización particular, el microbio proporcionado a ambos biorreactores es *Clostridium autoethanogenum*.

En ciertas realizaciones de la invención, el biorreactor de crecimiento 1 incluye un sistema de reciclado celular, en donde al menos una parte de biomasa microbiana puede eliminarse del medio nutriente líquido que sale del biorreactor de crecimiento y devolverse al biorreactor de crecimiento 1. Esto promueve la acumulación de biomasa en el reactor de crecimiento 1. De forma alternativa, la biomasa microbiana no se elimina del medio nutriente líquido que sale del reactor de crecimiento, sino que se pasa directamente al biorreactor de conversión 2.

En realizaciones particulares, el cultivo microbiano crece y produce ácidos en el reactor de crecimiento 1. Al menos una parte del mismo cultivo microbiano se pasa de forma continua o intermitente al biorreactor de conversión 2, junto con ácidos en el medio nutriente líquido, en donde las condiciones en el biorreactor de conversión 2 (tal como concentración de CO elevada) promueve la producción de alcohol por el mismo cultivo microbiano.

El tiempo de retención del medio nutriente líquido en el biorreactor de crecimiento 1 puede regularse para optimizar la acumulación de biomasa y/o producción de ácido. Por ejemplo, al comienzo, la acumulación de biomasa puede ser deseable y el caudal de medio nutriente líquido que pasa dentro y fuera del biorreactor de crecimiento 1 puede reducirse para aumentar el tiempo de retención del medio en el biorreactor de crecimiento 1 y así permitir que la biomasa y/o ácido alcancen niveles o tasas deseadas.

Cuando la producción de biomasa y/o ácido se aproxima o alcanza niveles o tasas deseadas, el tiempo de retención de líquido puede reducirse aumentando el caudal del medio nutriente líquido desde el biorreactor de crecimiento 1 al biorreactor de conversión 2. En ciertas realizaciones, los niveles de biomasa microbiana y/o ácido se monitorizan y el tiempo de retención puede ajustarse para alcanzar una concentración de ácido esencialmente en estado estacionario. Además, las condiciones pueden regularse también para alcanzar la concentración de ácido en estado estacionario deseado de al menos 5 g/L, o al menos 10 g/L, o al menos 20 g/L, o al menos 30 g/L, o al menos 40 g/L, o al menos 50 g/L, o al menos 60 g/L, o al menos 70 g/L, o al menos 80 g/L, o al menos 90 g/L o al menos 100 g/L, en el biorreactor de crecimiento 1.

El tiempo de retención de líquido de los medios nutrientes líquidos pueden regularse también en el biorreactor de conversión 2 para alcanzar la producción de alcohol eficiente. Por ejemplo, los medios nutrientes líquidos pueden proporcionarse de forma continua a una velocidad constante y el volumen del medio nutriente líquido en el biorreactor de conversión 2 puede ajustarse para proporcionar un tiempo de retención adecuado para alcanzar la conversión a alcohol deseable. En realizaciones particulares de la invención, la velocidad de producción de alcohol en la fase de conversión de alcohol a concentraciones de CO elevadas es más rápida que la velocidad de crecimiento y/o producción de ácido. Como tal, el biorreactor de conversión 2 puede ser esencialmente menor que el biorreactor de crecimiento 1 que lleva a tiempo de retención de líquido esencialmente menor en el biorreactor de conversión 2.

Sobre la consideración de la descripción actual, los expertos en la técnica apreciarán configuraciones adecuadas o deseables para cada biorreactor, sin embargo, en una realización particular, una parte del medio nutriente líquido que comprende un cultivo microbiano, el ácido y opcionalmente el alcohol se pasa a un segundo recipiente configurado como un biorreactor de flujo de tapón. La presión parcial de CO puede elevarse en el recipiente de flujo de tapón, de manera que como una parte del medio nutriente líquido cruza el(los) ácido(s) se convierte(n) a alcohol(es). Los expertos en la técnica apreciarán medios para mantener el flujo a través del biorreactor, tal como mezcladores estáticos. Además, el biorreactor puede incluir medios de reparto de sustrato adicionales en todas partes para mantener la concentración de CO necesaria y/o deseada en todo el biorreactor.

En otra realización, el biorreactor de producción comprende al menos un cultivo microbiano y el biorreactor de conversión comprende al menos un cultivo microbiano. Mientras el caldo de fermentación que contiene ácido(s) y/o alcohol(es) puede pasar del biorreactor de producción al reactor de conversión y del biorreactor de conversión a la recuperación de producto, los cultivos microbianos respectivos se retienen sustancialmente en cada biorreactor mediante sistemas de reciclado celular. En dichas realizaciones, los cultivos microbianos pueden ser diferentes, con tal que el cultivo en el biorreactor de producción produzca ácido(s) y el cultivo en el biorreactor de conversión convierta ácido(s) a alcohol(es). En unas realizaciones particulares, el cultivo microbiano en el biorreactor de conversión convierte ácido(s) a alcohol(es) a presión parcial de CO elevada.

En ciertas realizaciones, los ácido(s) producidos a partir de otros procesos de fermentación y/o industriales pueden añadirse al biorreactor de conversión como se desea para convertir a alcohol(es).

5 En otra realización, se proporciona un sistema de fermentación que comprende múltiples biorreactores de crecimiento, configurado para suministrar un biorreactor de conversión único, con medios nutrientes líquidos que comprenden ácidos y opcionalmente biomasa microbiana. Por ejemplo, en referencia a la Figura 6, el sistema de fermentación 101 comprende un primer y segundo biorreactor de crecimiento 1a y 1b, y cada uno puede configurarse para producir ácido(s). El medio nutriente líquido que contiene ácidos y opcionalmente biomasa de los biorreactores de crecimiento 1a y b, pueden alimentarse en el biorreactor de conversión 2 para la producción de alcohol. De forma alternativa, un primer biorreactor de crecimiento 1a puede configurarse para la rápida acumulación de biomasa (por ejemplo alto tiempo de retención de líquido), mientras el segundo biorreactor de crecimiento 1b se configura para la óptima producción de ácido (por ejemplo, menor tiempo de retención de líquido). Los tiempos de retención de líquidos de cada biorreactor de crecimiento 1a y b, pueden ajustarse por consiguiente para mantener las condiciones de producción de alcohol óptimas a lo largo de todo el sistema.

15 En realizaciones que incluyen múltiples biorreactores de crecimiento, uno o más biorreactores de crecimiento pueden cerrarse totalmente durante un periodo (tal como por mantenimiento), sin afectar esencialmente de forma adversa a la producción de alcohol.

Ejemplos

Preparación de medios:

| Componente del medio | Concentración por 1,0 L de Medio (LM23) | Concentración por 1,0 L de Medio (LM33) |
|--|---|---|
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,5 g | 0,5 g |
| NaCl | 0,2 g | 0,2 g |
| CaCl ₂ | 0,2 g | 0,2 g |
| tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 6,0)* | 160 ml | - |
| NaH ₂ PO ₄ | - | 2,04 g |
| NH ₄ Cl | 0,6 g | 2,5 g |
| H ₃ PO ₄ al 85% | 0,05 ml | - |
| KCl | 0,15 g | 0,15 g |
| disolución de metal traza compuesto (LSO6) | 10 ml | 10 ml |
| Disolución de vitamina B compuesta (LS03) | 10 ml | 10 ml |
| Resazurina (1000 mg/L de existencias) | 1 ml | 2 mL |
| FeCl ₃ | 0,0025 g | 0,01 g |
| Cisteína HCl monohidrato | 0,75 g | 0,5 g |
| Agarosa (opcional) | 15 g | 15 g |
| Agua destilada | A 1 litro | A 1 litro |
| * Combinan NaH ₂ PO ₄ (13,2 g) y Na ₂ HPO ₂ .7H ₂ O (1,1 g) en H ₂ O (1L). | | |

| Disolución de vitamina B compuesta (LS03) | por L de existencias | Disolución de metal traza compuesto (LSO6) | por L de existencias |
|---|----------------------|--|----------------------|
| Biotina | 20,0 mg | ácido nitrilotriacético | 1,5 g |

ES 2 536 786 T3

| | | | |
|-----------------------------|-----------|--|-----------|
| ácido fólico | 20,0 mg | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 3,0 g |
| hidrocloruro de piridoxina | 10,0 mg | MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,5 g |
| HCl de tiamina | 50,0 mg | NaCl | 1,0 g |
| Riboflavina | 50,0 mg | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 g |
| ácido nicotínico | 50,0 mg | Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ ·6H ₂ O | 0,8 g |
| D-(*)-pantotenato de calcio | 50,0 mg | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,2 g |
| Vitamina B12 | 50,0 mg | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g |
| ácido p-aminobenzoico | 50,0 mg | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0,02 g |
| ácido tióctico | 50,0 mg | AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O | 0,02 g |
| Agua destilada | A 1 litro | H ₃ BO ₃ | 0,30 g |
| | | NaMoO ₄ ·2H ₂ O | 0,03 g |
| | | Na ₂ SeO ₃ | 0,02 g |
| | | NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0,02 g |
| | | Na ₂ WO ₄ ·6H ₂ O | 0,02 g |
| | | Agua destilada | A 1 litro |

5 El medio se preparó a pH 5,5 como sigue. Todos los ingredientes con la excepción de cisteína-HCl se mezclaron en 400 ml de agua destilada. Esta disolución se hizo anaeróbica calentando a ebullición y dejándola enfriar a temperatura ambiente bajo un flujo constante de gas al 95% de CO, 5% de CO₂. Una vez frío, se añadió la cisteína-HCl y el pH de la disolución se ajustó a 5,5 antes de llevar el volumen hasta 1000 ml; la anaerobicidad se mantuvo a lo largo de los experimentos.

Bacterias:

10 *Clostridium autoethanogenum* se obtuvieron del Centro de Recursos Alemán para Material Biológico (DSMZ). El número de acceso dado a las bacterias es DSMZ 10061. De forma alternativa, el *Clostridium autoethanogenum* usado es el depositado en el Centro de Recursos Alemán para Material Biológico (DSMZ) y asignado con el número de acceso 19630.

Fermentación continua en reactor de tanque agitado continuo (CSTR) (montaje típico):

15 Un biorreactor de cinco litros se cargó con 4,9 L de medios LM23 o LM33 preparados como se describe anteriormente. El gas se convirtió a 95% de CO, 5% de CO₂ a presión atmosférica antes de la inoculación con 100 ml de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum*. El biorreactor se mantuvo a 37°C agitado a 200 rpm al comienzo del cultivo. Durante la fase de crecimiento, la agitación se aumentó a 400 rpm. El pH se ajustó a 5,5 y se mantuvo por adición automática de NaOH 5 M. Medios anaeróbicos frescos se añadieron continuamente en el biorreactor para mantener un nivel de biomasa y acetato definidos en el biorreactor.

Fermentación en cargas bajo presión en botella de suero

20 Se purgaron botellas de suero estériles tres veces con gas que contiene CO (véase los ejemplos para la composición) y después se evacuaron a un vacío de -34,47 kPa (-5 psi). 50 ml de cultivo activo que contenía biomasa, acetato y trazas de etanol a presión atmosférica se transfirieron directamente de un biorreactor en continuo en la botella de suero de 234 ml. El espacio de cabeza de 204 ml se rellenó entonces con gas que contiene CO a la sobrepresión necesaria. Una incubadora de agitación se usó y la temperatura de reacción se mantuvo a 37°C.

25

Densidad celular:

5 Para determinar la densidad celular en estos experimentos, la absorbancia de las muestras se midió a 600 nm (espectrofotómetro) y la masa seca se determinó por medio de cálculo según procedimientos publicados. El nivel de metabolitos se caracterizó usando Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) y en algunos casos Cromatografía de Gases (GC).

HPLC:

Sistema HPLC Agilent 1100 Series. Fase móvil: ácido sulfúrico 0,0025N. Flujo y presión: 0,800 mL/min. Columna: Alltech IOA; Catálogo núm. 9648, 150 x 6,5 mm, tamaño de partícula 5 µm. Temperatura de columna: 60°C. Detector: Índice refractivo. Temperatura del detector: 45°C.

10 Método para la preparación de la muestra:

400 µL de muestra y 50 µL de ZnSO₄ 0,15M y 50 µL de Ba(OH)₂ 0,15M se cargan en un tubo Eppendorf. Los tubos se centrifugan durante 10 min. a 12.000 rpm, 4°C. 200 µL del sobrenadante se transfieren en un vial de HPLC, y 5 µL se inyectan en el instrumento HPLC.

Cromatografía de gases:

15 Cromatógrafo de gases HP 5890 series II que utiliza un detector de ionización de llama. Columna GC capilar: EC1000- Alltech EC1000 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. El cromatógrafo de gases se operó en modo reparto con un flujo total de hidrógeno de 50 mL/min con flujo de purga de 5 mL (reparto 1:10), una presión en la cabeza de la columna de 10 PIS que da por resultado una velocidad lineal de 45 cm/seg. El programa de temperatura se inició a 60°C, se dejó durante 1 minuto después se inclinó a 215°C a 30°C por minuto, después se dejó durante 2 minutos. 20 La temperatura del inyector fue 210°C y la temperatura del detector fue 225°C.

Método para la preparación de la muestra:

500 µL de muestra se centrifuga durante 10 min a 12.000 rpm, 4°C. 100 µL del sobrenadante se transfieren en un vial de GC que contiene 200 µL de agua y 100 µL de disolución desoxidante estándar interna (10 g/L de propan-1-ol, 5 g/L de ácido iso-butírico, ácido clorhídrico 135 mM). 1 µL de la disolución se inyecta en el instrumento de GC.

25 Ejemplo 1: Conversión de ácido orgánico al alcohol correspondiente

Ejemplo 1A: Conversión de ácido butírico a butanol en un CSTR

Un reactor de ocho litros se llenó con 7200 ml de los medios LM23 y se pusieron en autoclave durante 30 minutos a 121°C. Mientras se enfriaba, el medio se trató por aspersión con N₂. El gas se cambió a 95% de CO, 5% de CO₂ antes de la inoculación con 160 ml de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum*. El biorreactor se mantuvo a 37°C 30 agitado a 200 rpm al comienzo del cultivo. Durante la fase de crecimiento, la agitación se aumentó a 500 rpm. El pH se ajustó a 5,5 y se mantuvo por adición automática de NaOH 5 M. La disolución de n-butirato que contiene 20 g de ácido butírico tamponado a pH 5,5 se añadió directamente en el cultivo de crecimiento activo. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 0, 24 y 48 horas después de la adición de ácido butírico (véase la Tabla 1).

| Tiempo[h] | 0 | 24 | 48 |
|-----------------------|-----|-----|-----|
| Butanol producido [g] | 0,0 | 4,0 | 8,2 |

Tabla 1: Conversión de 20 g de n-butirato en 1-butanol mediante un cultivo de 8 litros de *C. autoethanogenum* produciendo acetato y etanol en un biorreactor mantenido a pH 5,5. Condiciones de partida: cultivo activo de *C. autoethanogenum*, que produce acetato (8,3 g/l) y etanol (5,4 g/l) a pH 5,5 y gas de aspersión que contiene 95% de CO en CO₂.

35 Ejemplo 1B: Conversión de acetato y butirato a alcoholes correspondientes:

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Una vez que se estableció el crecimiento microbiano (asociado con acetato y pequeñas cantidades de etanol producido), los compuestos siguientes se añadieron en los 50 ml de cultivo activo en la botella de suero: 1 ml de disolución de ditionita sódica 10 g/l, 2 ml de disolución de ácido n-butírico 100 g/l (pH ajustado a 5,5 con hidróxido sódico 5 M). La fase gaseosa se intercambió durante 40 sobrepresión de 273,693 kPa (25 psig) de una mezcla de gas al 95% de CO, 5% de CO₂. Después de la adición del ácido, 1 ml de muestra se tomó para la cuantificación de los metabolitos a varios puntos temporales (véase la Tabla 2).

| Tiempo (h) | Conc. metil viológeno (mM) | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Conc. de butirato (g/L) | Conc. de butanol (g/L) |
|------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| 0 | 0 | 4,50 | 1,26 | 4,19 | 0,00 |
| 2 | 0 | 5,00 | 1,40 | 3,93 | 0,16 |
| 4 | 0 | 4,19 | 1,28 | 3,68 | 0,30 |
| 22 | 0 | 4,61 | 1,44 | 3,81 | 0,41 |
| 0 | 0,8 | 4,72 | 1,24 | 3,81 | 0,00 |
| 2 | 0,8 | 4,87 | 1,42 | 3,66 | 0,17 |
| 4 | 0,8 | 4,88 | 1,49 | 3,42 | 0,34 |
| 22 | 0,8 | 4,15 | 1,84 | 2,27 | 1,35 |

Tabla 2: Conversión de n-butirato en 1-butanol mediante un cultivo de *C. autoethanogenum* que produce acetato y etanol en una botella de suero a pH 5,5 en presencia o ausencia de metilviológeno 0,8 mM (MV). Condiciones de partida: cultivo activo de *C. autoethanogenum*, que produce acetato (4,7 g/l) y etanol (1,2 g/l) a pH 5,5, espacio de cabeza: sobrepresión de 273,693 kPa (25 psig) de 95% de CO en CO₂.

La presencia del mediador metil viológeno inhibe significativamente la conversión de n-butirato a n-butanol (Tabla 2). Además, el ácido butírico se convirtió estequiométricamente a butanol (Figura 1).

5 Los resultados ilustran un número de ventajas significativas sobre métodos presentados previamente para la conversión microbiana de ácidos a sus alcoholes correspondientes. Por ejemplo, demuestran por primera vez que *Clostridium autoethanogenum* (*C. auto*) puede usarse para producir alcoholes que no se sabe que son capaces de producir bajo condiciones de fermentación estándar.

10 Las células bacterianas no necesitan cosecharse antes de la adición de ácido para producir un alcohol deseado; la conversión de ácido a alcohol se lleva a cabo directamente en los medios de cultivo. Esto reduce significativamente el manejo de células, el riesgo de daño celular que puede estar provocado por centrifugado y resuspensión, y el riesgo de contaminación por oxígeno.

15 La conversión no necesita el uso de un mediador, tal como metilo viológeno. De hecho, la adición de metil viológeno se demostró que inhibe o al menos reduce la velocidad de conversión de ácidos a alcoholes. Dichos mediadores son a menudo tóxicos. Eliminar la necesidad de un mediador tiene la ventaja de reducir el manejo de compuestos químicos tóxicos y reducir los costes asociados con la producción de alcoholes.

Al menos en el caso de *C. autoethanogenum*, las células bacterianas pueden mantenerse al mismo pH y temperatura durante la fase de crecimiento y la fase de conversión de ácido a alcohol (37°C y pH 5,5). Esto simplifica el proceso y reduce el riesgo de choque a las células.

20 Además, la adición del ácido cuando las bacterias están en la fase de conversión, y la capacidad de las células para continuar el consumo de monóxido de carbono y producir acetato y etanol (por ejemplo) mientras se convierten los ácidos añadidos a alcoholes correspondientes, proporciona un método en que un número de productos valiosos pueden producirse simultáneamente.

Ejemplo 1C: Conversión de varios ácidos a alcoholes correspondientes:

25 Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Sin embargo, 5 mL de una disolución de ácido acuoso se añadió al vial vacío y el pH se ajustó a 5,5 con NaOH. Se añadió ditionato sódico (0,5 mL de una disolución acuosa a 10 g/L) o cisteína (1 mL de una disolución acuosa a 6,25 g/L) antes de la inoculación. Cada vial de suero se presurizó a 308,167 kPa (30 psig) con gas al 95% de CO y se incubó a 37°C con agitación constante. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 72 h (véase la Tabla 3).

| Agente reductor | Ácido | Concentración inicial de ácido (g/L) | Concentración de alcohol a las 72 h (g/L) |
|------------------|-------------|--------------------------------------|---|
| Ditionita sódica | propiónico | 0,9 | 0,14 (propanol) |
| Ditionita sódica | propiónico | 1,4 | 0,38 (propanol) |
| Ditionita sódica | Butírico | 2,3 | 0,17 (butanol) |
| Ditionita sódica | Butírico | 3,1 | 0,52 (butanol) |
| Ditionita sódica | Valérico | 1,0 | 0,14 (pentanol) |
| Ditionita sódica | Valérico | 1,7 | 0,24 (pentanol) |
| Ditionita sódica | Hexanoico | 0,9 | 0,06 (hexanol) |
| Ditionita sódica | Hexanoico | 1,7 | 0,09 (hexanol) |
| Cisteína | Isovalérico | 1,41 | 0,03 (3-metilbutanol) |

| | | | |
|----------|-----------------|------|-----------------------|
| Cisteína | 2-metilbutírico | 1,87 | 0,06 (2-metilbutanol) |
|----------|-----------------|------|-----------------------|

Tabla 3: Conversión de diversos ácidos a alcoholes correspondientes mediante *Clostridium autoethanogenum*. Como puede verse anteriormente, el *Clostridium autoethanogenum* puede usarse para convertir una variedad de ácidos a sus alcoholes correspondientes en presencia de un agente reductor. De nuevo, esto es particularmente significativo, ya que no se sabe que los ácidos y alcoholes anteriores sean metabolitos producidos de forma natural de *C. auto*.

Ejemplo 2: Efecto de la concentración de agente reductor en la producción de alcohol

Ejemplo 2A: Efecto de la concentración de ditionita sódica en la producción de alcohol

5 Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Sin embargo, se añadió ditionato sódico (disolución acuosa a 10 g/L) antes de la inoculación. Cada vial de suero se presurizó a 308,167 kPa (30 psig) con gas al 70% de CO, 15% de CO₂, 14% de N₂, 1% de H₂ y se incubó a 37°C con agitación constante. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 48 h (véase la Tabla 4).

| Conc. de ditionita sódica (g/L) | Conc. final de acetato (g/L) | Conc. final de etanol (g/L) |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 12,2 | 0,5 |
| 0,1 | 10,9 | 0,6 |
| 0,15 | 10,1 | 1,0 |
| 0,2 | 9,6 | 1,9 |
| 0,3 | 10,2 | 1,4 |
| 0,4 | 10,2 | 1,0 |
| 0,5 | 10,2 | 1,0 |

Tabla 4: Conversión de acetato a etanol a diferentes concentraciones de ditionita sódica mediante *Clostridium autoethanogenum*.

10 Los resultados significan que mientras se da la conversión de ácido a alcohol durante un amplio intervalo de concentraciones de agente reductor, hay una concentración óptima de aproximadamente 2 g/L.

Ejemplo 2B: Efecto de la concentración de sulfuro sódico en la producción de alcohol

Se purgaron botellas de suero de 234 ml estériles con gas al 100% de N₂ y después se añadieron 50 ml de medio (LM33) según la receta anterior y después de trataron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El medio se redujo con disolución de Cr(II) (aprox. 0,4 mM) y se añadió disolución acuosa de sulfuro sódico. Las botellas de suero se inocularon con 2,5 ml de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* creciendo activamente desde un biorreactor continuo. El espacio de cabeza de 184 ml se purgó tres veces con gas al 70% de CO, 1% de H₂, 15% de CO₂, y 14% de N₂ y se evacuó a un vacío de -197,851 kPa (-14 psig) para eliminar el resto de N₂ y se rellenó entonces con gas al 70% de CO, 1% de H₂, 15% de CO₂, y 14% de N₂ a 308,167 kPa (30 psig). La temperatura de reacción se mantuvo a 37°C. Se tomaron muestras a intervalos y el espacio de cabeza se purgó y se refrescó hasta 206,842 kPa (30 psi) después del muestreo (véase Tabla 5).

| Tiempo (h) | 10mM Na ₂ S | | 6mM Na ₂ S | | 3mM Na ₂ S | | 1mM Na ₂ S | | 0mM Na ₂ S | |
|------------|------------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
| | Acet. (g/L) | EtOH (g/L) | Acet. (g/L) | EtOH (g/L) | Acet. (g/L) | EtOH (g/L) | Acet. (g/L) | EtOH (g/L) | Acet. (g/L) | EtOH (g/L) |
| 5 | 0,46 | 0 | 0,40 | 0 | 0,41 | 0 | 0,45 | 0 | 0,44 | 0 |
| 23 | 0,50 | 0,09 | 0,49 | 0 | 0,45 | 0 | 0,42 | 0 | 0,89 | 0 |
| 30 | 0,50 | 0 | 0,54 | 0 | 0,49 | 0 | 0,42 | 0 | 1,12 | 0 |
| 52 | 0,51 | 0 | 0,49 | 0,20 | 0,72 | 0 | 0,42 | 0 | 2,90 | 0 |
| 77 | 0,47 | 0,19 | 0,35 | 0,37 | 0,60 | 0,22 | 0,50 | 0,11 | 4,12 | 0 |
| 95 | 0,39 | 0,29 | 0,25 | 0,47 | 0,56 | 0,30 | 0,31 | 0,40 | 4,15 | 0 |
| 102 | 0,35 | 0,31 | 0,23 | 0,5 | 0,54 | 0,30 | 0,30 | 0,42 | 4,17 | 0 |
| 118 | 0,33 | 0,37 | 0,18 | 0,56 | 0,52 | 0,31 | 0,20 | 0,50 | 4,20 | 0 |
| 126 | 0,33 | 0,4 | 0,18 | 0,58 | 0,53 | 0,35 | 0,20 | 0,55 | 4,17 | 0 |
| 143 | 0,31 | 0,48 | 0,18 | 0,64 | 0,50 | 0,40 | 0,13 | 0,63 | | |
| 166 | 0,24 | 0,57 | 0,15 | 0,66 | 0,42 | 0,51 | 0,14 | 0,66 | | |

Tabla 5: Conversión de acetato a etanol a diferentes concentraciones de sulfuro sódico mediante *Clostridium autoethanogenum*. Nota: los viales de suero con diversas concentraciones de sulfuro sódico se hicieron marchar por duplicado y se proporcionaron promedios.

Los resultados indican que mientras hay una breve fase de retraso asociada con un pequeño aumento en la concentración de acetato, el acetato en cada uno de los viales que contienen sulfuro sódico se convierte en alcoholes durante el tiempo de duración del experimento.

15 Ejemplo 3: Efecto de la presión parcial de CO

Ejemplo 3A: Efecto de la presión parcial de CO en la producción de alcohol

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 206,842 o 275,790 o 344,737k Pa (30 o 40 o 50 psia) usando una mezcla de gas al 95% de CO en CO₂ y se incubó a 37°C con agitación constante. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 18 h (véase la Tabla 6).

| Sobrepresión de partida | 206,84 kPa (30 psia) | 275,79 kPa (40 psia) | 344,73 kPa (50 psia) |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Acetato (g/l) | 5,4 | 5,7 | 0,2 |
| Etanol (g/l) | 0,5 | 0,8 | 2,6 |
| Sobrepresión final (psig) | 2 (115,11 kPa) | 8 (156,48 kPa) | 29 (301,27 kPa) |
| Caida de presión (psi) | 13 (89,63 kPa) | 17 (117,21 kPa) | 6 (41,36 kPa) |

Tabla 6: Efecto de diferentes sobrepresiones del espacio de cabeza en el metabolismo de un sustrato gaseoso que comprende 95% de CO en CO₂ mediante un cultivo de *C. autoethanogenum* en una botella de suero a pH 5,5 después de 18 horas de fermentación. Condiciones de partida: cultivo continuo de *C. autoethanogenum*, que contiene 3,3 g/l de acetato y 0,0 g/l de etanol a pH 5,5.

En las botellas de biorreactor a 206,842 kPa (30 psi) a 275,790 kPa (40 psi), aproximadamente 2 g/l de acetato y 0,6 g/l de etano se produjeron y la caída de presión en el espacio de cabeza fue aproximadamente 117,210 kPa (17 psi). Esto indica que una cantidad sustancial del CO se ha usado para la producción de acetato.

5 Sorprendentemente, a 344,737 kPa (50 psi), aproximadamente 3 g/l de acetato se consumió y 2,6 g/l de etanol se produjo. Los resultados indican que hay una presión parcial de CO umbral óptima a la que se da la conversión de acetato a alcohol durante un periodo extenso. Como la concentración de CO es proporcional a la presión parcial de CO, los resultados indican que hay un umbral de concentración de CO suficiente al que *C. auto* convierte ácidos a alcoholes. Sin embargo, debería notarse que los sistemas de menor presión pueden convertir también ácidos a alcohol, aunque como CO se agota la producción de acetato prevalece. Adicionalmente, bajo condiciones
10 particularmente agotadas de CO (o H₂), el cultivo puede reconsumir alcohol para producir acetato (véase ejemplo 4).

Ejemplo 3B: Efecto de la presión parcial de CO en la producción de alcohol

En base a estos resultados, una fermentación similar se llevó a cabo usando el mismo sustrato gaseoso con medios suplementados con diferentes fuentes de carbono. Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 275,790 o 344,737 kPa (40 o 50 psia) usando una mezcla de gas al 95% de CO en CO₂ y se incubó a 37°C con agitación constante. Una botella de biorreactor de control (A) no se suplementó, mientras las demás botellas se suplementaron con algo de fructosa (B), xilosa (C) o piruvato (D). Estas botellas se incubaron a 37°C con agitación constante. Las concentraciones de metabolitos y biomasa, además de la sobrepresión del espacio de cabeza y pH, se midieron al comienzo de la fermentación y después de 40 horas. Los resultados a 275,790 kPa (40 psia) se muestran en la Tabla 7 y los resultados a 344,737 kPa (50 psia) se muestran en la Tabla 8.
15
20

| A | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Suplemento |
|------------|---------|--------|---------|------------------|------|------------|
| Principio | 6,3 | 0,4 | 0,7 | 25 (273,69 kPa) | 5,5 | |
| Final | 10,0 | 1,0 | 0,7 | 7 (149,58 kPa) | 4,6 | |
| Diferencia | +3,7 | +0,6 | +0,0 | -18 (225,43 kPa) | -0,9 | |
| B | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Fructosa |
| Principio | 6,3 | 0,5 | 0,7 | 25 (273,69 kPa) | 5,5 | 0,9 |
| Final | 10,1 | 1,7 | 0,7 | 9 (163,37 kPa) | 4,6 | 0,0 |
| Diferencia | +3,8 | +1,2 | +0,0 | -16 (211,64 kPa) | -0,9 | -0,9 |
| C | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Xilosa |
| Principio | 6,1 | 0,4 | 0,7 | 25 (273,69 kPa) | 5,5 | 0,8 |
| Final | 9,8 | 1,4 | 0,9 | 7 (149,58 kPa) | 4,6 | 0,1 |
| Diferencia | +3,7 | +1,0 | +0,2 | -18 (225,43 kPa) | -0,9 | -0,7 |
| D | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Piruvato |
| Principio | 7,0 | 0,0 | 0,8 | 25 (273,69 kPa) | 5,5 | 0,8 |
| Final | 10,1 | 0,8 | 0,7 | 8 (156,48 kPa) | 4,8 | 0,0 |
| Diferencia | +3,1 | +0,8 | -0,1 | -17 (218,53 kPa) | -0,7 | -0,8 |

Tabla 7: Metabolismo de sobrepresión de 275,79 kPa (40 psia) de un sustrato gaseoso que comprende 95% de CO en CO₂ mediante un cultivo de *C. autoethanogenum* en una botella de suero a pH 5,5 después de 40 horas de fermentación. Condiciones de partida: cultivo continuo de *C. autoethanogenum* a velocidad de dilución: 0,04 h⁻¹, flujo continuo de sustrato gaseoso que comprende 95% de CO en CO₂ (sin sobrepresión) que produce acetato y etanol a pH 5,5. Datos para acetato, etanol, fructosa, xilosa piruvato son concentraciones en gramo por litro. La biomasa se da como gramos de peso de célula seca por litro. La sobrepresión de gas en el espacio de cabeza se muestra en psig.

En todas las botellas de biorreactor a 275,790 kPa (40 psia), para todas las condiciones ensayadas aquí, aproximadamente 3,5 g/l de acetato y cantidades menores de etanol se produjeron. La caída de presión en el espacio de cabeza fue aproximadamente 218,535 kPa (17 psig). Esto indica que una parte sustancial del CO se ha

consumido para la producción de acetato. El pH disminuyó en aproximadamente 0,9 unidades a 4,6. En todos los casos, hay mínimo crecimiento microbiano.

| A | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Suplemento |
|------------|---------|--------|---------|------------------|------|------------|
| Principio | 6,3 | 0,4 | 0,7 | 35 (342,64 kPa) | 5,5 | |
| Final | 1,1 | 4,3 | 0,4 | 25 (273,69 kPa) | 6,4 | - |
| Diferencia | -5,2 | +3,9 | -0,3 | -10 (170,27 kPa) | +0,9 | |
| B | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Fructosa |
| Principio | 6,3 | 0,5 | 0,7 | 35 (342,64 kPa) | 5,5 | 0,9 |
| Final | 1,9 | 3,9 | 0,4 | 28 (294,37 kPa) | 6,4 | 0,0 |
| Diferencia | -4,4 | +3,4 | -0,3 | -7 (149,56 kPa) | +0,9 | -0,9 |
| C | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Xilosa |
| Principio | 6,1 | 0,4 | 0,7 | 35 (342,64 kPa) | 5,5 | 0,8 |
| Final | 2,8 | 3,4 | 0,4 | 30 (308,16 kPa) | 6,4 | 0,0 |
| Diferencia | -3,3 | +3,0 | -0,3 | -5 (135,79 kPa) | +0,9 | -0,8 |
| D | Acetato | Etanol | Biomasa | Sobrepresión | pH | Piruvato |
| Principio | 7,0 | 0,0 | 0,8 | 35 (342,64 kPa) | 5,5 | 0,8 |
| Final | 1,5 | 4,5 | 0,4 | 26 (280,58 kPa) | 6,5 | 0,0 |
| Diferencia | -5,5 | +4,5 | -0,4 | -9 (160,37 kPa) | +1,0 | -0,8 |

Tabla 8: Metabolismo de sobrepresión de 344,737 kPa (50 psia) de un sustrato gaseoso que comprende 95% de CO en CO2 mediante un cultivo de *C. autoethanogenum* en una botella de suero a pH 5,5 después de 40 h de fermentación. Condiciones de partida: cultivo continuo de *C. autoethanogenum* a velocidad de dilución = 0,04 h⁻¹, flujo continuo de sustrato gaseoso que comprende 95% de CO en CO2 (sin sobrepresión), que produce acetato y etanol a pH 5,5. Datos para acetato, etanol, fructosa, xilosa, piruvato son concentraciones en gramo por litro. La biomasa se da como gramo de peso seco de células por litro. La sobrepresión de gas en el espacio de cabeza se muestra en psig.

- 5 En todas las botellas de biorreactor a 344,737 kPa (50 psia), para todas las condiciones ensayadas aquí, cantidades significativas de acetato se consumieron, y más de 3 g/l de etanol se produjeron. Hay una fuerte correlación entre el consumo de acetato y la producción de etanol. El consumo de acetato/producción de etanol se da de tal forma que para cada mol de acetato consumido se produjo aproximadamente un mol de etanol (Tabla 9). Sin embargo, el carbohidrato suplementado (o piruvato) se consumió esencialmente, y los niveles de biomasa, estimada por densidad óptica, disminuyó. En cada ejemplo, la caída de presión en el espacio de cabeza fue por debajo de 68,94 kPa (10 psi). En todos los casos, el pH aumentó en aproximadamente 0,9 unidades a 6,4.
- 10

| | Gas solo | Gas y fructosa | Gas y xilosa | Gas y piruvato |
|--|----------|----------------|--------------|----------------|
| 1. Acetato consumido / acetato al comienzo | 0,83 | 0,70 | 0,54 | 0,79 |
| 2. Etanol producido / acetato al comienzo | 0,81 | 0,70 | 0,64 | 0,84 |
| 3. Etanol producido / Acetato consumido | 0,98 | 1,01 | 1,19 | 1,07 |

Tabla 9: Relaciones molares para fermentación por cargas a sobrepresión de 241,316 kPa (35 psi), en base a los resultados mostrados en la Tabla 2 y 3.

5 Dado el acetato consumido/acetato de partida (fila 1), al menos el 50% y en algunos casos sobre el 75% del acetato presente en el caldo de fermentación se consume a presión elevada. Dado el etanol producido/acetato de partida (fila 2), al menos el 60% y en algunos casos al menos el 80% del ácido consumido se sustituye por alcohol. Dado el etanol producido/acetato consumido (fila 3), hay una fuerte correlación entre la cantidad de acetato consumido en el proceso de fermentación y el alcohol producido. El nivel teórico de CO disuelto en los medios a sobrepresión del espacio de cabeza de 275,790 y 344,737 kPa (40 y 50 psia) se calculó en la Tabla 10 en base a la ley de Henry.

| Sobrepresión en el espacio de cabeza | psia | 40 (275,79 kPa) | 50 (344,73 kPa) |
|---|--------|----------------------|----------------------|
| Presión parcial de CO en el espacio de cabeza | psi | 37,7 (259,93 kPa) | 47,2 (325,43 kPa) |
| Concentración de CO disuelto en los medios | mmol/l | 2,43 | 3,05 |

Tabla 10: Cálculo de la concentración de CO disuelto en los medios a diferente sobrepresión del espacio de cabeza de un sustrato gaseoso que comprende el 95% de CO en CO₂. La constante de Henry para CO en agua a 298 K es 1052,6 L.atm.mol⁻¹.

10 Los resultados presentados aquí demuestran que hay una presión parcial de CO por encima de la que el metabolismo de *C. autoethanogenum* cambia sustancialmente de la producción de acetato y biomasa desde el sustrato de CO a la conversión de al menos una parte de acetato en etanol. Así, para una presión parcial de CO por debajo de 255,106 kPa (37 psi), el acetato y la biomasa son los productos principales del metabolismo de gas de CO y el pH se vuelve ácido, y el crecimiento adicional se inhibe. Cuando la presión parcial de CO está por encima de 255,106 kPa (37 psi), el crecimiento de biomasa y producción de acetato parecen inhibirse, y se da el consumo de acetato. Además, la producción de etanol se da con menor consumo de CO. Al mismo tiempo, el pH aumenta hasta 15 que alcanza 6,5, donde las bacterias parecen estar esencialmente inhibidas y la conversión de acetato a etanol se detiene. No hay efecto visible de la fructosa, xilosa o piruvato a la concentración ensayada.

Ejemplo 3C: Efecto de la presión parcial de CO en la producción de alcohol

20 Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 273,693 kPa (25 psig (40 psia)) con el gas indicado y se incubó a 37°C con agitación constante. Muestras del caldo de fermentación se tomaron a intervalos de 1h, 3h y 5h (véase la Tabla 11).

| Composición del gas | Tiempo | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Presión (psig) |
|-----------------------|--------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 100% CO | | | | |
| | 0 | 11,914 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,273 | 0,523 | 25,1 (274,38 kPa) |
| | 3 | 10,488 | 1,295 | 22,7 (257,83 kPa) |
| | 5 | 10,337 | 1,518 | 21,4 (248,87 kPa) |
| 90% CO; 10% N2 | | | | |
| | 0 | 11,914 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,177 | 0,548 | 23,3 (261,97 kPa) |
| | 3 | 10,407 | 1,315 | 21,2 (247,49 kPa) |
| | 5 | 10,12 | 1,602 | 19,5 (235,77 kPa) |
| 80% CO; 20% N2 | | | | |
| | 0 | 11,914 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,389 | 0,44 | 23,9 (266,10 kPa) |
| | 3 | 11,042 | 1,055 | 22,5 (256,45 kPa) |
| | 5 | 10,605 | 1,267 | 21,3 (248,18 kPa) |
| 70% CO; 30% N2 | | | | |
| | 0 | 11,914 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,341 | 0,538 | 25,8 (279,20 kPa) |
| | 3 | 10,51 | 1,193 | 23,4 (262,66 kPa) |
| | 5 | 10,579 | 1,445 | 21,8 (251,63 kPa) |
| 60% CO; 40% N2 | | | | |
| | 0 | 11,914 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,311 | 0,565 | 26,3 (282,68 kPa) |
| | 3 | 10,959 | 1,297 | 23,5 (263,35 kPa) |
| | 5 | 10,493 | 1,5 | 21,6 (250,25 kPa) |
| 50% CO; 50% N2 | | | | |
| | 0 | 11,9 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,3 | 0,533 | 25,9 (279,89 kPa) |
| | 3 | 11,0 | 1,236 | 23,5 (263,35 kPa) |
| | 5 | 10,5 | 1,448 | 21,9 (252,32 kPa) |

Tabla 11: conversión de acetato a alcohol a varias presiones parciales de CO por Clostridium autoethanogenum durante 5 horas.

Los resultados indican que la presión parcial de CO umbral suficiente al que se convierten los ácidos a alcoholes es menor que 137,895 kPa (20 psia). Durante una breve escala de tiempo de reacción (cf. ejemplos 3A-C), el acetato se convierte a alcohol esencialmente de forma estequiométrica a todas las presiones parciales de CO ensayadas. Por consiguiente, la presión parcial de CO sobre 137,895 kPa (20 psia) es suficiente para que *C. auto* convierta ácidos a alcoholes.

5

Ejemplo 4: Efecto de la composición del gas

Ejemplo 4A: Efecto del gas puro en la conversión de acetato a etanol

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizo a 273,693 kPa (25 psig (40 psia)) con el gas indicado y se incubó a 37°C con agitación constante. Muestras del caldo de fermentación se tomaron a intervalos de 1h, 3h y 5h (véase la Tabla 12).

10

| Composición de gas | Tiempo | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Presión (psig) |
|---|--------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 100% N2 | | | | |
| | 0 | 12,531 | 0,133 | 26,1 (281,27 kPa) |
| | 1 | 12,742 | 0 | 27,5 (290,93 kPa) |
| | 3 | 12,394 | 0 | 27,1 (288,17 kPa) |
| | 5 | 12,551 | 0 | 26,6 (284,72 kPa) |
| 100% H2 | | | | |
| | 0 | 12,531 | 0,133 | 25,8 (279,20 kPa) |
| | 1 | 11,921 | 0,384 | 24,8 (272,31 kPa) |
| | 3 | 11,811 | 0,527 | 23,3 (261,97 kPa) |
| | 5 | 11,998 | 0,546 | 22,5 (256,45 kPa) |
| Gas residual de planta siderúrgica (aprox. 53% de CO; 18% de CO2; 26% de N2; 3% de H2) | | | | |
| | 0 | 12,531 | 0,133 | 24,8 (272,31 kPa) |
| | 1 | 11,256 | 1,007 | 23,6 (264,04 kPa) |
| | 3 | 10,668 | 1,605 | 20,6 (243,35 kPa) |
| | 5 | 11,688 | 1,362 | 16,7 (216,46 kPa) |

Tabla 12: conversión de acetato a etanol por *Clostridium autoethanogenum* usando composiciones de gas alternativas.

Los resultados claramente indican que un gas reductor, tal como CO o H2 es necesario para que *C. auto* convierta ácidos a alcoholes. Se considera que el hidrógeno puede usarse en lugar de CO ya que la ruta metabólica de ácidos a alcoholes incluye enzimas hidrogenasa. Se considera además que mientras H2 es una fuente de energía adecuada para convertir ácidos a alcoholes no sería adecuada para la biosíntesis y/o producción de acetato, que necesita una fuente de carbono además de una fuente de energía.

15

Ejemplo 4B: Efecto de la composición de gas en la producción de etanol

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Sin embargo, antes de la inoculación, los viales se pincharon con disolución de ácido butírico tamponado a pH 5,5 con NaOH (ac.). Las concentraciones iniciales a t = 0 fueron acetato a 6,7 g/l y butirato a 0,8 g/L (no estuvo presente ni etanol ni butanol). Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 24 h (véase la Tabla 13).

20

| Composición de gas | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Conc. de butirato (g/L) | Conc. de butanol (g/L) |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| 100% CO (40psia) (275,79 kPa) | 4,7 | 1,8 | 0,4 | 0,3 |
| 100% CO (50psia) (344,73 kPa) | 4,2 | 1,9 | 0,3 | 0,4 |
| 75% CO 25% H2 (40psia) (275,79 kPa) | 5,5 | 1,3 | 0,5 | 0,2 |
| 60% CO 40% H2 (50psia) (344,73 kPa) | 5,0 | 1,6 | 0,5 | 0,5 |

Tabla 13: Conversión de ácidos a alcoholes bajo diferentes presiones parciales de CO por *Clostridium autoethanogenum*, en presencia y ausencia de hidrógeno.

5 Los ácidos, tal como ácidos butírico y acético, pueden convertirse a alcoholes que incluyen etanol y butanol en presencia de sustratos de CO/H2 mezclados. Claramente, en la ausencia de H2, la presión parcial de CO aumentada mejora la conversión total. Sin embargo, la presencia de H2, en particular a presión parcial elevada también mejora la conversión total.

Ejemplo 4C: Efecto de la composición de gas en la producción de etanol

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 342,641 kPa (35 psig (50 psia)) con el gas indicado y se incubó a 37°C con agitación constante. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 18 h (véase la Tabla 14).

| Composición de gas | Cambio en conc. de | | Presión de gas final (psia) | | |
|------------------------|--------------------|------------------|-----------------------------|---------------|----------------|
| | acetato (g/L) | de alcohol (g/L) | CO | H2 | CO2 |
| 100% CO | -1,6 | +2,3 | 37 (255,10 kPa) | - | 9 (62,05 kPa) |
| 40% CO, 40% H2, 20% N2 | -1,2 | +2,5 | 0 | 8 (55,19 kPa) | 11 (75,84 kPa) |

Tabla 14: Conversión de acetato en etanol bajo diferentes presiones parciales de CO por *Clostridium autoethanogenum*, en presencia y ausencia de hidrógeno.

10 Los sustratos mezclados que comprenden CO y H2 pueden usarse para convertir ácidos a alcoholes en presencia de *C. auto*. De forma interesante, sobre la escala temporal del experimento, se produce significativamente más alcohol que acetato se consume. Esto indica que mientras el acetato puede convertirse de forma estequiométrica en etanol, acetato adicional se acumula y puede convertirse a alcohol hasta que el CO se consuma completamente.

15 Ejemplo 4E: Efecto de la presión parcial de CO y H2 en la producción de alcohol

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 342,641 kPa (35 psig (50 psia)) con el gas indicado y se incubó a 37°C con agitación constante. Muestras del caldo de fermentación se tomaron a intervalos de 1,5h, 3h, 5h y 24h (véase la Tabla 15).

| Composición de gas | Tiempo | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Presión (psig) |
|--|--------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 80% CO₂; 20% H₂ | | | | |
| | 0 | 10,8 | 0,2 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1,5 | 9,5 | 1,6 | 34,8 (341,26 kPa) |
| | 3,25 | 9,3 | 2,4 | 32,2 (323,33 kPa) |
| | 4,75 | 9,2 | 2,6 | 30,3 (310,23 kPa) |
| | 6,75 | 9,4 | 2,5 | 28,7 (299,20 kPa) |
| | 23 | 13,7 | 0,8 | 21,6 (250,25 kPa) |
| 60% CO₂; 40% H₂ | | | | |
| | 0 | 10,8 | 0,2 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1,5 | 9,5 | 1,7 | 34,1 (336,43 kPa) |
| | 3,25 | 9,5 | 2,6 | 30,6 (312,30 kPa) |
| | 4,75 | 9,4 | 3,0 | 28,2 (295,75 kPa) |

| | | | | |
|--|------|------|-----|-------------------|
| | 6,75 | 9,5 | 3,1 | 25,4 (276,45 kPa) |
| | 23 | 10,2 | 3,9 | 12,6 (188,19 kPa) |

Tabla 15: Conversión de acetato en etanol bajo diferentes presiones parciales de CO y H₂ por *Clostridium autoethanogenum*.

Los resultados indican que a niveles elevados de H₂, hay una mejora en la conversión total de ácidos en alcoholes. Sin embargo, se considera que el etanol se reconvierte de nuevo a acetato ya que los niveles de H₂ se agotan durante el curso del experimento, particularmente a bajos niveles de H₂ (por ejemplo, 20%).

5 Ejemplo 4F: Efecto de la presión parcial de CO en gas residual de planta siderúrgica

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 273,693 kPa (25 psig (40 psia)) con gas residual de planta siderúrgica (aprox. 53% de CO; 18% de CO₂; 26% de N₂; 3% de H₂) y se incubó a 37°C con agitación constante. Muestras del caldo de fermentación se tomaron a intervalos de 1h, 3h y 5h (véase la Tabla 16).

| Presión de gas inicial | Tiempo | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Presión (psig) |
|----------------------------|--------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 46psia (317.45 kPa) | | | | |
| | 0 | 14,217 | 0,224 | 31 (315,06 kPa) |
| | 1 | 13,335 | 0,696 | 31,2 (316,44 kPa) |
| | 3 | 12,775 | 1,811 | 26,4 (283,34 kPa) |
| | 5 | 13,053 | 2,197 | 21,2 (247,49 kPa) |
| 40psia (275.79 kPa) | | | | |
| | 0 | 14,217 | 0,224 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 13,395 | 0,665 | 26,1 (281,27 kPa) |
| | 3 | 12,896 | 1,77 | 21,2 (247,49 kPa) |
| | 5 | 14,012 | 1,675 | 15,6 (208,88 kPa) |
| 30psia (206.84 kPa) | | | | |
| | 0 | 14,217 | 0,224 | 15 (204,74 kPa) |
| | 1 | 13,485 | 0,623 | 15,9 (210,95 kPa) |
| | 3 | 12,909 | 1,742 | 11,9 (183,37 kPa) |
| | 5 | 14,363 | 1,364 | 8,2 (157,86 kPa) |

Tabla 16: Conversión de acetato a etanol a diferentes presiones parciales de CO usando gas residual de planta siderúrgica.

Los gases residuales de planta siderúrgica pueden usarse para convertir ácidos en alcoholes. Aumentar la presión parcial de CO en el gas residual, tiene un efecto beneficioso en la conversión de ácido.

Ejemplo 4G: Efecto de la presión parcial de CO₂ en la producción de etanol

- Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Cada vial de suero se presurizó a 342,641 kPa (35 psig (50 psia)) con el gas indicado y se incubó a 37°C con agitación constante. Muestras del caldo de fermentación se tomaron a intervalos de 1h, 3h y 5h (véase la Tabla 17).

| Composición del gas | Tiempo | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Presión (psig) |
|--|--------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 40% CO₂; 60% N₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 8,798 | 0,502 | 35,3 (344,70 kPa) |
| | 3 | 8,31 | 1,076 | 33,3 (330,92 kPa) |
| | 5 | 7,89 | 1,478 | 30,9 (314,37 kPa) |
| 40% CO₂; 50% N₂; 10% CO₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 8,721 | 0,509 | 35 (342,64 kPa) |
| | 3 | 8,078 | 1,092 | 33,4 (331,60 kPa) |
| | 5 | 7,69 | 1,511 | 31,1 (315,75 kPa) |
| 40% CO₂; 40% N₂; 20% CO₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 8,778 | 0,488 | 35,4 (346,39 kPa) |
| | 3 | 8,115 | 1,057 | 32,9 (328,16 kPa) |
| | 5 | 7,383 | 1,461 | 31,2 (316,44 kPa) |
| 40% CO₂; 30% N₂; 30% CO₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 8,763 | 0,473 | 34 (335,74 kPa) |
| | 3 | 8,12 | 0,994 | 32,8 (327,47 kPa) |
| | 5 | 7,769 | 1,4 | 31 (315,06 kPa) |
| 40% CO₂; 20% N₂; 40% CO₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 8,761 | 0,465 | 34 (335,74 kPa) |
| | 3 | 8,191 | 0,962 | 32,9 (328,16 kPa) |
| | 5 | 7,771 | 1,366 | 30,6 (312,20 kPa) |
| 40% CO₂; 10% N₂; 50% CO₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 9,255 | 0 | 34,5 (339,19 kPa) |
| | 3 | 9,527 | 0,106 | 34 (336,74 kPa) |
| | 5 | 9,131 | 0,235 | 33 (328,85 kPa) |
| 40% CO₂; 60% CO₂ | | | | |
| | 0 | 9,256 | 0 | 35 (342,64 kPa) |
| | 1 | 8,814 | 0,384 | 32,2 (323,33 kPa) |
| | 3 | 8,23 | 0,737 | 31,5 (318,50 kPa) |
| | 5 | 8,365 | 1,046 | 30 (308,16 kPa) |

Tabla 17. Conversión de acetato a etanol a diferentes presiones parciales de CO₂ por Clostridium autoethanogenum.

Los sustratos que comprenden CO que contienen una variedad de constituyentes pueden demandarse para convertir ácidos en alcoholes. Sin embargo, se nota que niveles aumentados de CO₂ tienen un ligero efecto inhibitor en la producción de alcohol.

Ejemplo 5: Efecto de la adición de formiato:

5 Ejemplo 5A: Concentración de formiato en recipientes por cargas:

Los viales de suero se prepararon de acuerdo con lo anterior. Sin embargo, una disolución de formiato acuoso se añadió al vial vacío y el pH se ajustó a 5,5 con NaOH antes de la inoculación. Cada vial de suero se presurizó a 273,693 kPa (25 psig) con gas al 50% de CO; 12,5% de CO₂; 37,5% de N₂ y se incubó a 37°C con agitación constante. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a 72 h (véase la Tabla 18).

| Concentración de formiato (g/L) | Tiempo(h) | Conc. de acetato (g/L) | Conc. de etanol (g/L) | Presión (psig) |
|---------------------------------|-----------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 0g/L | | | | |
| | 0 | 11,10 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 11,36 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 4 | 10,98 | 0,25 | 22,9 (259,21 kPa) |
| | 20 | 13,38 | 0,158 | 13,3 (193,02 kPa) |
| | 48 | 13,00 | 0,16 | 13 (190,95 kPa) |
| | 72 | 13,70 | 0,17 | 12,7 (188,88 kPa) |
| 2 g/L | | | | |
| | 0 | 9,6 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 8,7 | 1,02 | 25 (273,69 kPa) |
| | 4 | 7,3 | 2,22 | 22,9 (259,21 kPa) |
| | 20 | 6,4 | 3,12 | 20,1 (239,90 kPa) |
| | 48 | 6,1 | 3,99 | 19,9 (238,53 kPa) |
| | 72 | 5,9 | 4,28 | 18,1 (226,12 Kpa) |
| 5 g/L | | | | |
| | 0 | 9,6 | 0 | 25 (273,69 kPa) |
| | 1 | 8,7 | 0,85 | 25 (273,69 kPa) |
| | 4 | 7,3 | 1,92 | 22,9 (259,21 kPa) |
| | 20 | 6,4 | 2,65 | 20,7 (244,04 kPa) |
| | 48 | 6,1 | 3,44 | 19,9 (238,53 kPa) |
| | 72 | 5,9 | 3,76 | 19,1 (233,01 kPa) |

Tabla 18: Conversión de acetato a etanol en presencia de formiato a diferentes concentraciones usando *Clostridium autoethanogenum*.

10

En ausencia de formiato, *C.auto* continua produciendo acetato y una pequeña cantidad de alcohol. Sin embargo, cuando se añade formiato a la reacción de fermentación, el acetato se convierte a alcohol en cantidades sustancialmente estequiométricas. La velocidad de conversión es la más alta a bajas concentraciones de formiato (2 g/L), indicando que puede haber un efecto inhibitor y/o tóxico a mayores concentraciones de formiato.

Ejemplo 5B: Adición de formiato en un CSTR:

5 L de medio de fermentación anaeróbico (preparado como se describe anteriormente) en un CSTR de 5 litros se inoculó con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* creciendo de forma activa (DSMZ 19630) a un nivel de 5% (v/v). Un flujo continuo de gas al 70% de CO y 15 % de CO₂ 1% de H₂ 14% de N₂ se introdujo al fondo del recipiente fermentador a través de un burbujeador de difusión a un caudal volumétrico de 60 ml/minuto. El pH inicial del fermentador se mantuvo a 5,5. Después de varios días de crecimiento microbiano, se estableció un cultivo continuo encendiendo una bomba que introduce medio de fermentación fresco burbujeador con N₂ en el CSTR a un caudal de 2 mL/min. Los controladores de nivel se emplean para mantener el nivel correcto de cultivo en el recipiente fermentador, ajustado usando una sonda de nivel y bomba que enciende automáticamente cuando el nivel de los recipientes fermentadores sube demasiado alto y bombea el cultivo fuera del recipiente hasta que el nivel cae de nuevo al nivel ajustado, esto permite un suministro estacionario de medio fresco para proporcionar al cultivo y un cultivo de alta viabilidad, creciendo activamente, para mantener.

Después de varios días de operación continua, el suministro de medio fresco se paró y el fermentador volvió a la configuración de carga. Al tiempo=0 (Figura 2) se añadió ácido fórmico (15 mL) y el pH se ajustó a 5,5 añadiendo NaOH. Durante el curso de aproximadamente 30 minutos, el pH de los medios de fermentación creció a 6 ya que el acetato se consumió por el cultivo y el etanol se produjo. Consecuentemente, se añadió ácido fórmico adicional (3 mL) para disminuir el pH de nuevo a 5,5. A aproximadamente t=60 min, se introdujo ácido fórmico por medio de una bomba de dosificación configurada para dosificar automáticamente en el reactor cuando el pH subía por encima del punto de ajuste de 5,5. La bomba de dosificación de formiato se hizo marchar durante aproximadamente 5 horas, durante cuyo tiempo se consumió acetato por el cultivo y se produjo etanol.

Los resultados muestran que una reacción de fermentación que produce continuamente acetato puede cambiarse de producción de acetato a conversión de acetato a alcohol perturbando el sistema, por ejemplo, añadiendo formiato. La conversión es esencialmente estequiométrica durante el curso del experimento.

Ejemplo 6: Efecto de adición de acetato adicional

1 L de medio de fermentación anaeróbico (preparado como se describe anteriormente con las siguientes alteraciones: una menor concentración de disolución de vitamina [0,4 ml/L de LS03 sin ácido pantoténico y 500 ul/L de disolución de ácido pantoténico (40 mg/L)] se añadió a la disolución madre) en un CSTR de 1L inoculado con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* creciendo activamente (DSMZ 19630) a un nivel de 5% (v/v). Un flujo continuo de gas al 35% de CO y 60% de H₂ 5% de CH₄ se introdujo al fondo del recipiente fermentador a través de un burbujeador de difusión a un caudal volumétrico de 10 ml/minuto. El pH inicial del fermentador se mantuvo a 5,5. Después de varios días de crecimiento microbiano, el caudal de gas aumentó a 20 ml/minuto y la agitación aumentó de 200 rpm a 500 rpm. Un cultivo continuo se estableció introduciendo medio fresco (preparado como se describe anteriormente con las alteraciones siguientes: una menor concentración de disolución de vitamina [0,4 ml/L de LS03 sin ácido pantoténico y 1 ml/L de disolución de ácido pantoténico (40 mg/L)] se añadió a la disolución madre) mientras se mantiene un volumen de medio constante en el fermentador. El caudal de medio fresco se aumentó de 6 ml/hora a 54 ml/hora durante varias semanas. Después de varias semanas de operación continua, el suministro de gas se cambió a 35% de CO 45% de H₂ 15% de CH₄ 5% de CO₂ y se operó durante varias semanas. La productividad de etanol se mantuvo a aproximadamente 6 g/L/día. En el día 52, el medio fresco suministrado al cultivo continuo se suplementó con 15 g/L de ácido acético tamponado a pH 5,5 durante 2 días. Durante este tiempo, la productividad de alcohol aumentó a aproximadamente 15 g/L (día 53 - Figura 3) después a 12 g/L (día 54). Se considera que una gran parte del acetato introducido en el fermentador se convirtió a alcohol.

Los resultados muestran que la productividad de alcohol puede mejorarse en una reacción de fermentación que produce de forma continua alcohol(es) añadiendo ácido(s) adicional(es). Añadir ácido(s) adicional(es) (por ejemplo, acetato) perturba la reacción de fermentación de manera que una parte sustancial del(de los) ácido(s) añadido(s) se convierte(n) a alcohol(es), tal como etanol.

Ejemplo 7: Efecto del pH en la producción de etanol usando gas que contienen CO

1 L de medio de medio de fermentación anaeróbica LM33 en un CSTR de 1 litro se inoculó con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* creciendo de forma activa (DSMZ 19630) a un nivel de 5% (v/v). Un flujo continuo de gas al 70% de CO y 15 % de CO₂ 1% de H₂ 14% de N₂ se introdujo al fondo del recipiente fermentador a través de un burbujeador de difusión a un caudal volumétrico de 19 ml/minuto. El pH inicial del fermentador se mantuvo a 5,5. Para la mayoría del experimento, la concentración de ácido acético del cultivo se mantuvo por debajo de 4 g/L mediante un reciclado celular y sistema de intercambio de medio. Las células se pasaron a través de una membrana de flujo cruzado Viva 200, el filtrado se recogió y las células se devolvieron al recipiente reactor. El filtrado se sustituyó con medio fresco para asegurar que el volumen medio dentro del reactor permanecía constante. En el día 3 el sistema de reciclado celular se apagó y el pH, que se había mantenido a aproximadamente 5,6 durante 3 días, con ORP fluctuando entre -400 y -430 mV se aumentó. El pH se ajustó a aproximadamente 5,9, y el ORP disminuyó a aproximadamente -470 mV.

5 Estos resultados muestran que, a pH 5,6, el acetato y el etano se producen simultáneamente, con un exceso de acetato. En referencia a la Figura 4, esta etapa de la fermentación se asocia también con un periodo de crecimiento microbiano. Cuando el pH se aumenta el ORP disminuye a aproximadamente -470 mV y la velocidad de producción de alcohol se aumenta a aproximadamente 1,2 g/L/día, mientras algo de acetato se consumió a una velocidad de aproximadamente 0,2 g/L/día. Por consiguiente, el cultivo microbiano puede cambiarse de una fase de producción donde se produce acetato, a una fase de conversión donde el acetato se convierte a etanol ajustando pH del medio nutriente líquido.

10 A lo largo de esta memoria y cualquier reivindicación que sigue, a menos que el contexto necesite otra cosa, las palabras "comprender", "que comprende" y similares, se van a construir en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo, que es decir, en el sentido de "que incluye, aunque no está limitado a".

REIVINDICACIONES

1. Un método para convertir ácido(s) a alcohol(es) correspondiente(s) usando un cultivo microbiano en presencia de un sustrato que comprende CO o CO y H₂, comprendiendo dicho método;
- 5 a. cultivar en un biorreactor una o más cepas de bacterias carboxidotróficas en presencia de dicho sustrato para producir uno o más ácidos y opcionalmente uno o más alcoholes, y
- b. perturbar el cultivo microbiano, de manera que al menos una parte del cultivo microbiano se cambie de una fase esencialmente de producción a una fase esencialmente de conversión, por lo cual al menos una parte de al menos uno de los uno o más de dichos ácidos se convierte a su alcohol correspondiente; y
- c. recuperar al menos una parte de los alcoholes.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la concentración de H₂ en el sustrato es menor que 40% en volumen.
3. El método según la reivindicación 1, en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridium*, *Moorella*, *Pyrococcus*, *Eubacterium*, *Desulfobacterium*, *Carboxydotherrmus*, *Acetogenium*, *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Butyribacterium* y *Peptostreptococcus*.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, en donde las bacterias carboxidotróficas tienen todas las características definidas de la cepa *Clostridium autoethanogenum* depositada en el Centro de Recursos Alemán para Material Biológico (DSMZ) bajo el número de depósito de identificación DSMZ 10061.
5. El método según la reivindicación 1, en donde el uno o más ácidos de la etapa (a) se producen de forma continua, y, el uno o más ácidos se convierten de forma continua al alcohol correspondiente en la etapa (b).
- 20 6. El método según la reivindicación 1, en donde dicho uno o más alcoholes se producen en la etapa (a) y una cantidad esencialmente mayor de ácido se produce en la etapa (a) respecto a la cantidad de alcohol producido en la etapa (a).
7. El método según la reivindicación 1, en donde el ácido producido en la etapa (a) es acetato y el alcohol correspondiente es etanol.
- 25 8. El método según la reivindicación 1, que comprende además añadir un ácido al biorreactor durante la etapa (a) y/o etapa (b) y convertir dicho ácido añadido a su alcohol correspondiente.
9. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa de perturbación se lleva a cabo por una o más de:
- a. ajustar el pH de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- b. ajustar el potencial redox abierto de un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- 30 c. añadir un segundo ácido al biorreactor;
- d. añadir uno o más agentes reductores al biorreactor;
- e. ajustar la concentración de CO en un medio nutriente líquido que contiene el cultivo microbiano;
- f. ajustar la presión parcial de CO en el biorreactor.
- 35 10. El método según la reivindicación 1, que comprende además llevar a cabo la etapa (a) en un primer biorreactor y la etapa (b) en un segundo biorreactor.
11. El método según la reivindicación 1, en donde el sustrato que comprende CO comprende al menos 15% a aproximadamente 100% de CO en volumen.
12. El método según la reivindicación 9, en donde la etapa de perturbación comprende la adición de un segundo ácido y el ácido se selecciona del grupo que consiste en formiato, acetato y mezclas de los mismos.
- 40 13. El método según la reivindicación 9, en donde la etapa de perturbación comprende la adición de un agente reductor y el agente se selecciona del grupo que consiste en ditionita sódica, cisteína, sulfuro sódico y mezclas de los mismos.
14. El método según la reivindicación 9, en donde la etapa de perturbación comprende ajustar la concentración de CO aumentando la concentración de CO en el medio nutriente líquido en al menos 1 mmol.
- 45 15. El método según la reivindicación 9, en donde la etapa de perturbación comprende ajustar la presión parcial de CO aumentando la presión parcial en al menos (15 psi) $1,03 \times 10^5$ Pa.

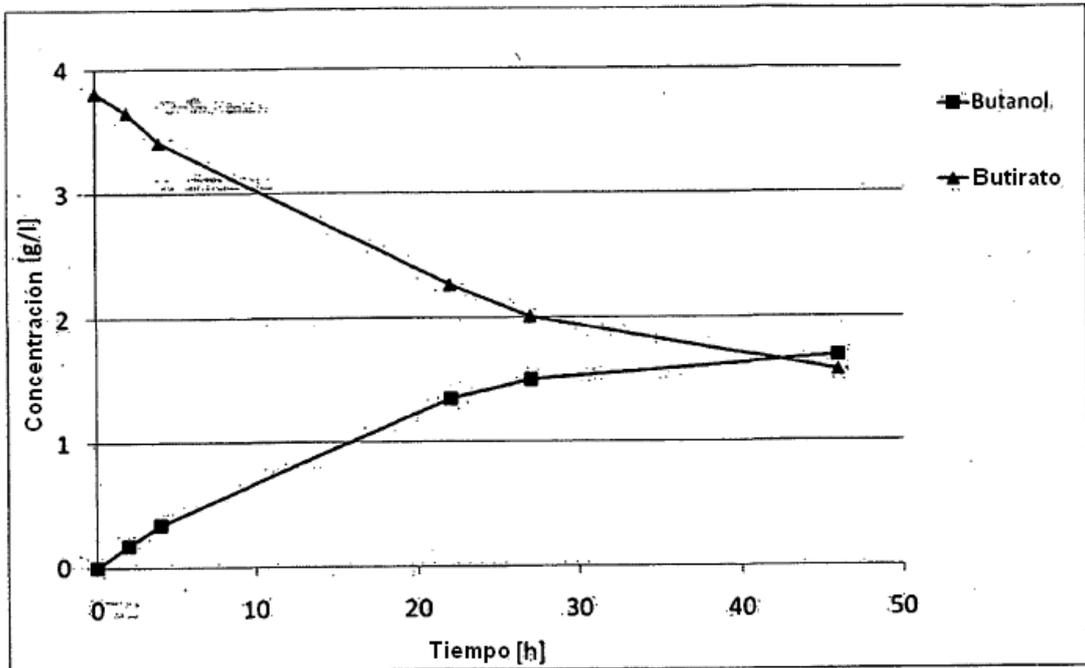


Figura 1

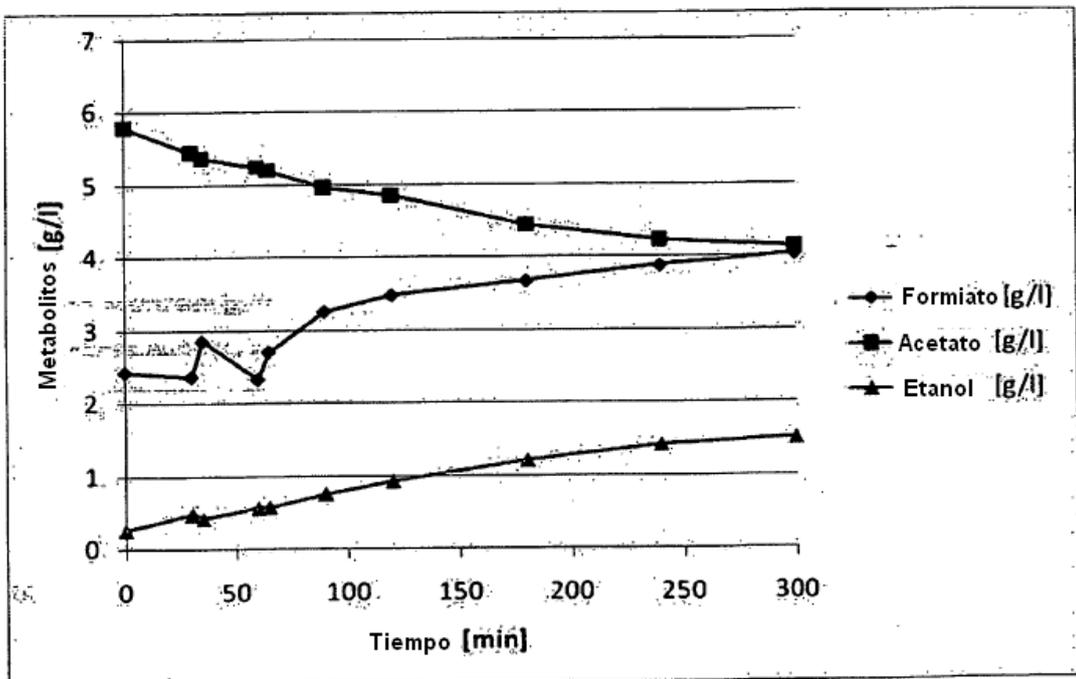


Figura 2

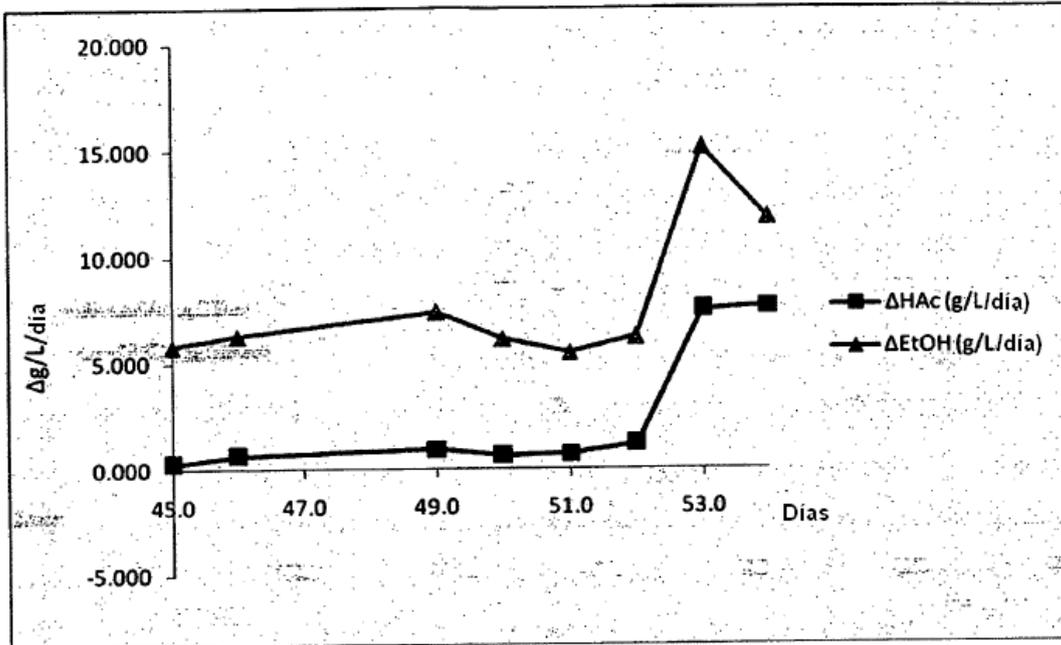


Figura 3

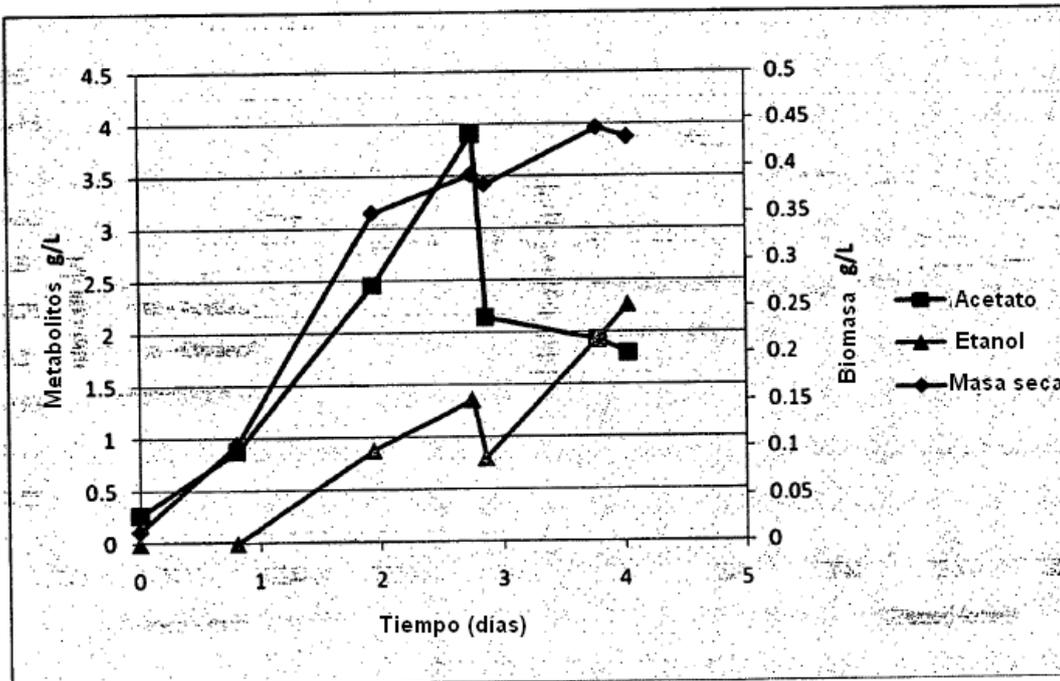


Figura 4

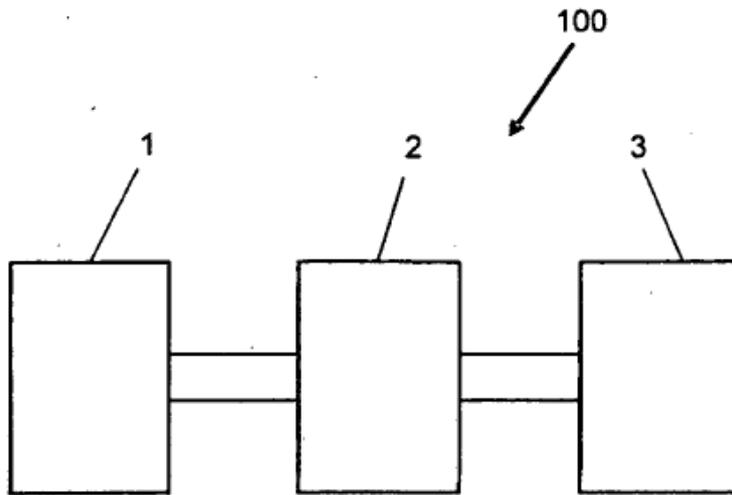


Figura 5

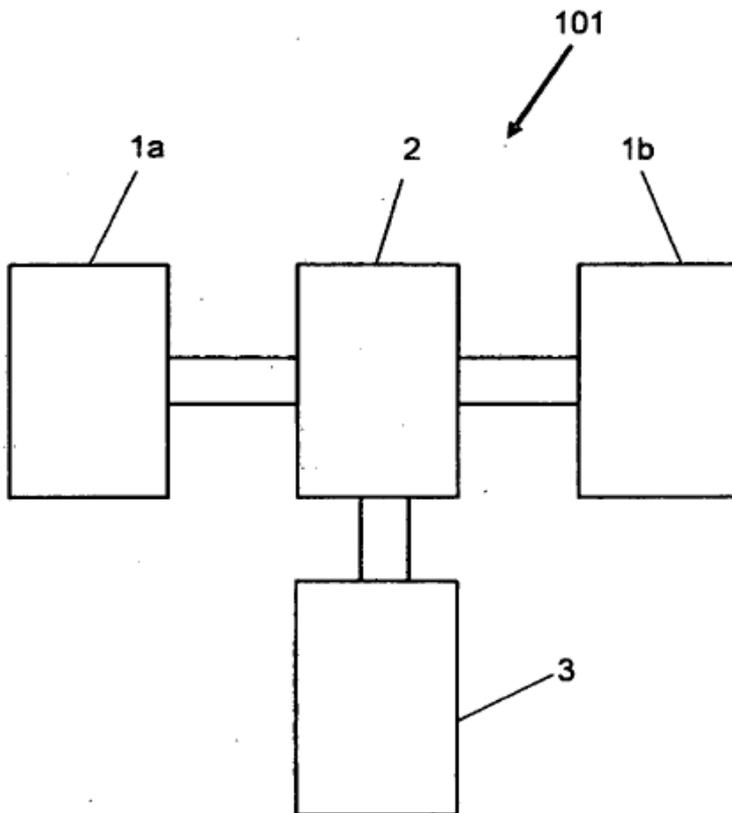


Figura 6