

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 073**

21 Número de solicitud: 201400709

51 Int. Cl.:

C12P 7/06

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

02.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.03.2016

Fecha de la concesión:

05.09.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.09.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA (100.0%)
OTRI - Edificio de Servicios Centrales de
Investigación, Campus de Elviña, s/n
15071 A Coruña (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**KENNES, Christian;
VEIGA BARBAZÁN, María Del Carmen y
NALAKATH ABUBACKAR, Haris**

54 Título: **Procedimiento de bioconversión selectiva de gases que contienen monóxido de carbono, en etanol, sin acumulación de ácido acético**

57 Resumen:

La presente invención describe un bioproceso que permite la producción de bioetanol sin ninguna acumulación de ácido acético al final del proceso de bioconversión. El sustrato utilizado en la bioconversión contiene monóxido de carbono alimentado en continuo a un biorreactor. La conversión del sustrato en etanol, en ausencia de ácido acético al final del proceso, se consigue aportando tungsteno al biorreactor, en presencia o en ausencia total de vitaminas, y ajustando el pH durante la fermentación. El biorreactor contiene como biocatalizador una o varias bacterias del género *Clostridium* u otro género microbiano capaz de realizar la conversión del sustrato en etanol.

ES 2 562 073 B2

**PROCEDIMIENTO DE BIOCONVERSIÓN SELECTIVA DE GASES QUE
CONTIENEN MONOXIDO DE CARBONO, EN ETANOL, SIN
ACUMULACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO**

5

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención es un procedimiento que se aplica en el sector de la bioenergía y que permite mejorar la producción de bioetanol a partir de contaminantes y de gas de
10 síntesis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La escasez cada vez mayor de combustibles fósiles, así como sus efectos negativos sobre el medio ambiente, obliga a buscar otras fuentes de energía u otros combustibles
15 alternativos. El (bio)etanol es uno de estos combustibles alternativos. La producción de etanol es posible por vía (petro)química, mediante reacciones químicas a partir de compuestos como el etileno, o por vía biológica. La vía biológica permite obtener bioetanol a partir de biomasa u otras fuentes renovables.

La ventaja de la biomasa es precisamente su carácter renovable, a diferencia de los
20 compuestos derivados del petróleo. La biomasa está formada por lignocelulosa. Después de unas etapas de pretratamiento e hidrólisis, los polisacáridos presentes en la lignocelulosa, son transformados en azúcares simples. Estos últimos son posteriormente fermentables en etanol (van Groenestijn et al.. Bioethanol. In: Kennes C and Veiga MC (eds). Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy. J. Wiley.
25 Chichester, UK, 2013, pp. 431-463, ISBN978-1-119-94331-0). Sin embargo, la biomasa está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La hidrólisis de la celulosa y de la hemicelulosa libera monosacáridos fermentables en etanol, pero los componentes de la lignina no pueden ser fermentados en etanol.

Otra alternativa consiste en realizar una gasificación de la biomasa para obtener el
30 llamado gas de síntesis. Una de las ventajas de esta tecnología es que tanto la celulosa y la hemicelulosa como la lignina se transforman en gases, que pueden ser utilizados por distintas bacterias para producir etanol.

El gas de síntesis es una mezcla de monóxido de carbono, hidrógeno y dióxido de carbono, principalmente. Varios de estos gases se encuentran también en algunos efluentes industriales. Su obtención es también posible mediante gasificación de
5 residuos u otros tipos de materias primas.

Existen bacterias capaces de convertir el CO, pero también mezclas de CO, H₂, y CO₂, en una mezcla de ácido acético y etanol, en condiciones anaerobias. Hay varios estudios que describen este proceso. En muchos casos, el principal producto es el ácido acético, con concentraciones menores de etanol. Desde hace pocos años, se están realizando
10 estudios para intentar maximizar la producción de etanol y minimizar la formación de ácido acético. Hasta día de hoy, en la mayoría de los casos siempre hay formación de ambos productos, el etanol y el ácido acético. En la presente invención se produce etanol en ausencia total de acumulación de ácido acético al final del proceso de bioconversión, en un biorreactor con alimentación continua del sustrato.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención permite obtener etanol por fermentación de un sustrato que contiene monóxido de carbono, en un biorreactor continuo, en ausencia de ácido acético al final del proceso, debido a la presencia de elementos químicos inorgánicos que
20 incluyen el tungsteno y el ajuste del pH durante el proceso. El sustrato se alimenta de forma continua al biorreactor, mientras que el medio nutritivo acuoso se introduce inicialmente en el sistema y se trata al final del proceso de conversión para separar el etanol de la mezcla acuosa.

De forma alternativa, se puede alimentar una fase acuosa en continuo, con un bajo caudal, separando el etanol de la mezcla que sale del biorreactor. El medio nutritivo
25 acuoso no necesita necesariamente la adición de una solución de vitaminas puras, ni necesita ser altamente reducido. El medio que se puede utilizar en el bioreactor tiene una composición típica para bacterias acidogénicas. No contiene carbohidratos. Un ejemplo de medio de que se puede utilizar es similar al descrito recientemente
30 (Abubackar et al. Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract, Bioresour. Technol., 2012, 114:518-522) y en el ejemplo más abajo; medio al cual se le añade tungsteno. Se mejora la productividad en etanol si además se modifica y ajusta el pH durante la fermentación.

La producción de etanol, sin acumulación final de ácido acético, se consigue mediante la adición de tungsteno (W) como único suplemento en el medio nutritivo. Adicionalmente, el ajuste del pH a lo largo del proceso de fermentación permite mejorar la productividad en etanol de forma significativa. La concentración en tungsteno puede estar comprendida entre 14 mgW/L y 140 mgW/L, añadido en forma de $\text{Na}_2\text{O}_4\text{W}_2\text{H}_{20}$ u otra forma similar. La omisión de tungsteno en el medio de cultivo resulta mayoritariamente en la formación de ácido acético, mientras que en presencia de este metal hay formación de etanol y ausencia de acumulación de ácido acético al final del proceso de bioconversión. La ausencia de ácido acético al final del proceso se consigue mediante una modificación del pH (acidificación) que permite la conversión total del ácido acético formado al principio de la fermentación (a pH inicial más elevado) en etanol. Este proceso se puede repetir de forma cíclica. Efectivamente, si después de haber conseguido la transformación microbiana de la totalidad del ácido acético en etanol, se vuelve a aumentar el pH del medio de cultivo, habrá de nuevo formación de ácido acético a partir del sustrato que contiene CO. Posteriormente, un nuevo ajuste del pH (acidificación) resultara nuevamente en la conversión completa del ácido acético en etanol, con un aumento de la concentración total final en etanol comparado con el primer ciclo.

El biorreactor puede ser un reactor con biomasa bacteriana en suspensión o un reactor con biomasa inmovilizada sobre un soporte.

Una de las ventajas de la invención, a parte de la mayor producción de etanol, es que el proceso de separación del etanol de la fase acuosa es más fácil debido a la ausencia del ácido acético como producto secundario al final del proceso de bioconversión.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1- Formación de etanol y ausencia de acumulación de ácido acético, en presencia de tungsteno, mediante la bioconversión de monóxido de carbono por *Clostridium autoethanogenum*

Figura 2- Formación de etanol y de ácido acético, en ausencia de tungsteno, mediante la bioconversión de monóxido de carbono por *Clostridium autoethanogenum*

Figura 3- Formación de etanol y de ácido acético, en presencia de tungsteno, con pH inicial de 5,75, ajustado a pH 4,75 al cabo de 90 horas de fermentación en este ejemplo;

lo cual resulta en la acumulación de etanol en ausencia total de ácido acético al final del proceso.

5 DESCRIPCIÓN DE UNA REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1: Producción de etanol en un biorreactor de tanque agitado con biomasa bacteriana en suspensión y alimentación continua del sustrato.

Se utiliza un biorreactor de tanque agitado con biomasa en suspensión. El medio que se introduce en el biorreactor, en este ejemplo, tiene la siguiente composición (por litro de agua destilada): NaCl, 0,90 g ; MgCl₂ .6H₂O, 0,40 g ; KH₂PO₄, 0,75 g ; K₂HPO₄, 1,50 g; extracto de levadura, 0,5 g; cysteine.HCl , 0,75 g; FeCl₃ .6 H₂O, 2,50 mg; resazurina, 0,50 mg; solución de micronutrientes SL-10 (según medio 320 de la DSMZ) 1 mL.

Al medio se le añade tungsteno en forma de Na₂O₄W.2H₂O , con una concentración de W de 14 mg/L. Se ajusta el pH a 4,75. De forma alternativa, se puede ajustar el pH a valores por encima de 5,5, para posteriormente ajustarlo a un valor más bajo durante el proceso de bioconversión.

Se inocula el biorreactor con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide, Archiv. Microbiol. 1994, 161:345-351). Se estima que la introducción del inóculo en el biorreactor aporta también trazas de tripticasa y de NH₄Cl (<0.10 g/L, en cada caso), así como concentraciones residuales de ácido acético y/o etanol (<0.15 g/L, en cada caso).

Se deja pasar nitrógeno durante unos minutos a través del sistema, para eliminar los restos de oxígeno y mantener condiciones anaerobias.

Se alimenta monóxido de carbono puro, en continuo, con un caudal de 10 mL(CO)/L(reactor).min, en condiciones estériles.

El pH del medio se mantiene constante de forma automática, mediante la adición de NaOH o HCl.

Las concentraciones de etanol y ácido acético en el medio se determinan por cromatografía líquida, HPLC, y aparecen en la Fig. 1, para el medio que contiene W. La simple omisión de W en el medio conduce a la formación de ácido acético en concentraciones elevadas comparado con el etanol, como se puede ver en la Fig. 2. En la Fig. 3 se puede observar que en presencia de W, con un pH inicial de 5,75,

posteriormente reducido a pH 4,75, hay formación inicial de ácido acético y etanol, seguido posteriormente por la (bio)eliminación natural del ácido acético mientras sigue aumentando la concentración en etanol.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de etanol durante la bioconversión de un sustrato que contiene monóxido de carbono y que permite obtener etanol sin acumulación alguna de ácido acético, mediante la adición de tungsteno al medio.
2. Procedimiento según reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) Preparación de un medio de cultivo para bacterias acetogénicas, que contiene tungsteno, en condiciones anaerobias y estériles, ajustando el pH al valor adecuado
- b) Inoculación de una cepa bacteriana acetogénica
- c) Alimentación, en continuo, de un gas que contiene monóxido de carbono o mezclas de gases que contienen monóxido de carbono
- 15 d) Separación del producto o de los productos del medio de fermentación, al final del proceso de bioconversión
3. Procedimiento, según reivindicaciones 1 y 2, donde el pH inicial se ajusta por encima de 5,5 para posteriormente reducirlo a valores más ácidos
- 20 4. Procedimiento, según reivindicaciones 1 y 2, donde el pH inicial se ajusta por encima de 5,5, para posteriormente reducirlo a valores más ácidos, y repetir el proceso de variación de pH de forma cíclica, eliminando el ácido acético a pH bajo y acumulando cantidades mayores de etanol a ese mismo pH bajo en cada ciclo.
- 25 5. Procedimiento, según reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, donde los productos finales son el etanol y el ácido acético, con una relación (etanol:ácidoacético) comprendida entre 10:5 y 10:0 al final del proceso.

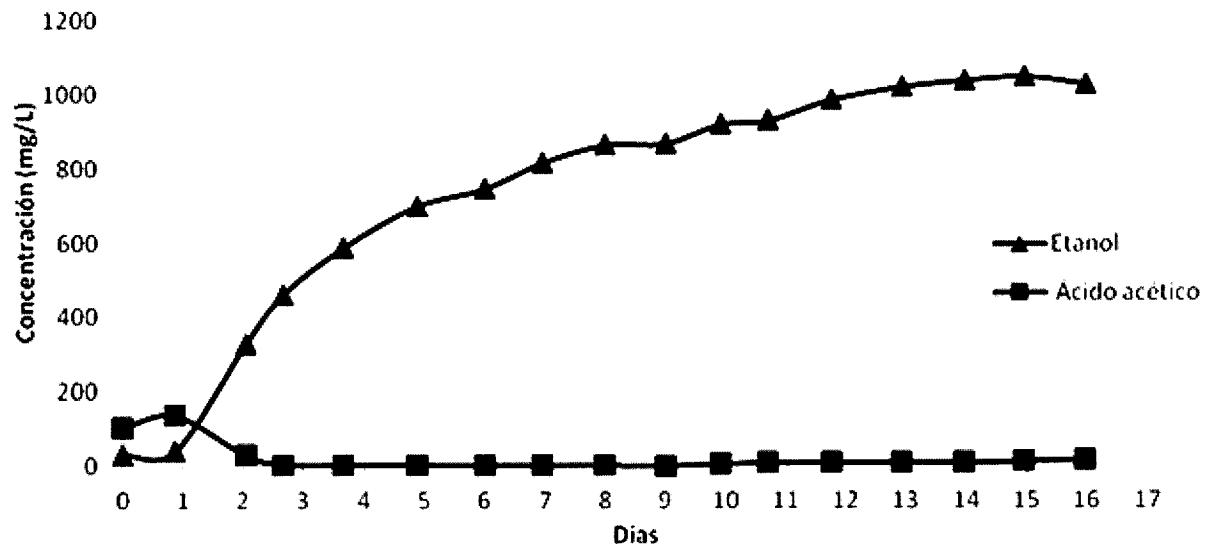


Figura 1

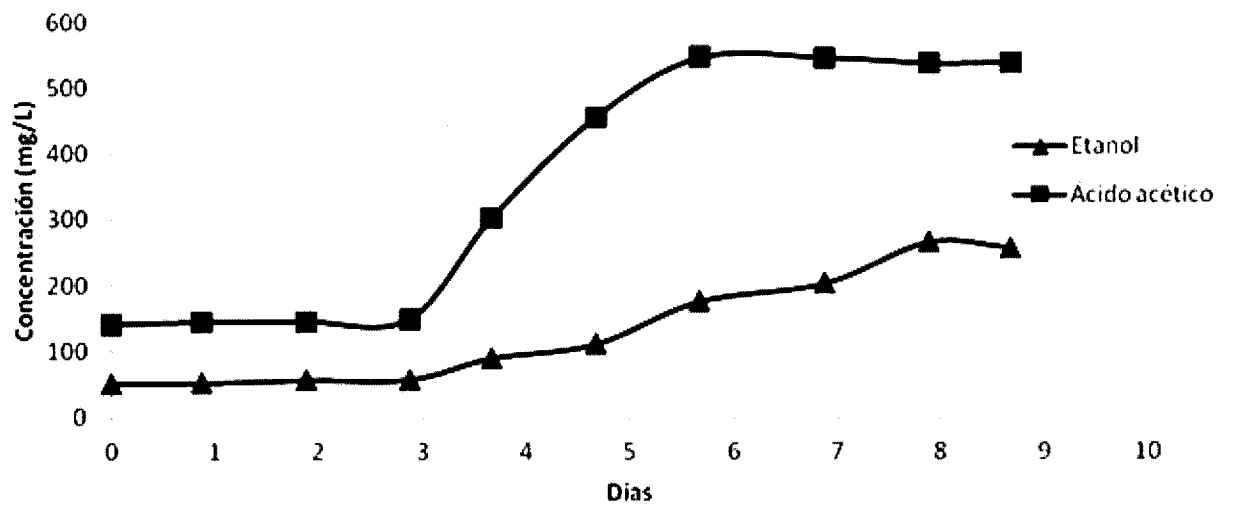


Figura 2

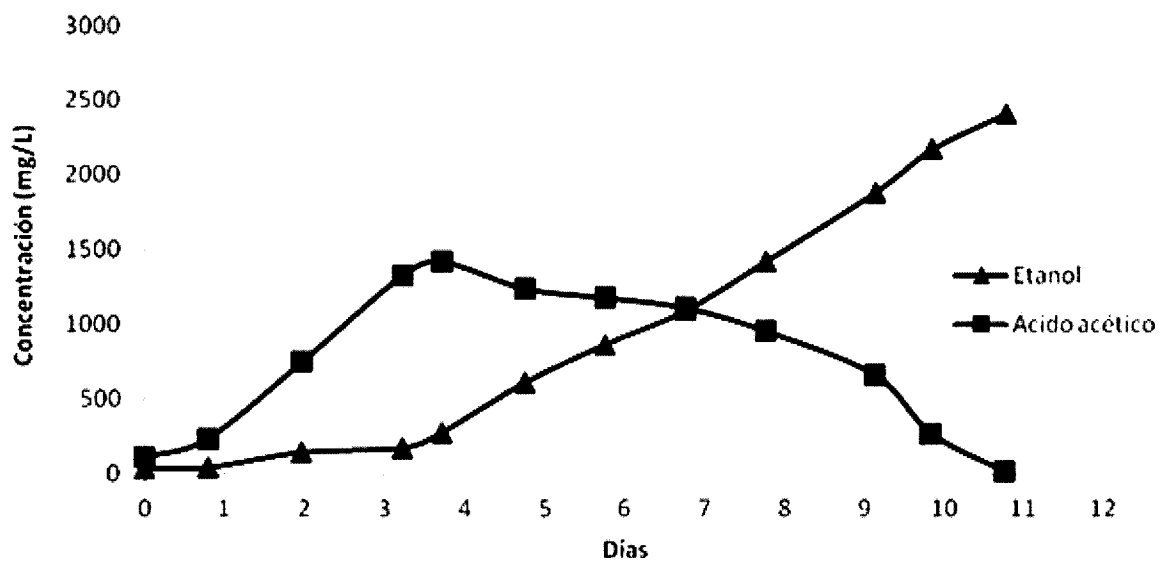


Figura 3



- ②① N.º solicitud: 201400709
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.09.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P7/06** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2012003373 A2 (COSKATA ENERGY [US/US]) 05.01.2012, página 1, líneas 11-25; página 15, línea 1 – página 16, línea 7; página 16, líneas 16-20; página 29, líneas 1-19.	1-6
A	ABUBACKAR HN et al. Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. Bioresource Technology 2012. Vol. 114: 518-522, página 518, resumen; página 519, columnas 1,2.	1-6
A	WO 2009092749 A1 (COMPAGNIE INDUSTRIELLE DE LA MATIERE VEGETALE CIMV) 30.07.2009, página 5, línea 26 – página 6, línea 31.	1-6
A	WO 2009091783 A2 (PENNSYLVANIA SUSTAINABLE TECHNOLOGIES, LLC [US/US]) 23.07.2009, página 1, resumen.	1-6
A	US 20120053368 A1 (SAKA et al.) 01.03.2012, página 1, resumen; página 6, reivindicaciones 1,9.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.02.2016

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2012003373 A2 (COSKATA ENERGY [US/US])	05.01.2012
D02	ABUBACKAR HN et al. Bioresource Technology. 2012. Vol. 114: 518-522.	21.03.2012
D03	WO 2009092749 A1	30.07.2009
D04	WO 2009091783 A2	23.07.2009
D05	US 20120053368 A1	01.03.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un bioproceso para producir bioetanol sin acumulación de ácido acético al final de la conversión, empleando un sustrato con monóxido de carbono alimentado en continuo a un biorreactor inoculado preferentemente con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum*. La conversión del sustrato en etanol, en ausencia de ácido acético, se consigue aportando tungsteno (W) al medio y ajustando el pH durante la fermentación (reivindicaciones 1-6).

El documento D01 divulga un bioproceso para la conversión de una mezcla de CO, CO₂ y H₂ en bioetanol, en un tanque de fermentación con un cultivo de microorganismos en condiciones anaerobias, empleando un medio adecuado para bacterias acidogénicas y manteniendo el control de la concentración de CO y CO₂ en el recipiente de fermentación (ver página 1, líneas 11-25; página 15, línea 1 - página 16, línea 7; página 16, líneas 16-20; página 29, líneas 1-19).

El documento D02 divulga un bioproceso que mejora la conversión de CO en etanol y ácido acético, aumentando el rendimiento, mediante la fermentación de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* en condiciones anaerobias, disminuyendo el pH y la concentración de extracto de levadura de 5,75 a 4,75 g/L y de 1,6 to 0,6 g/L, respectivamente (ver página 518, resumen; página 519, columnas 1, 2).

El documento D03 divulga un procedimiento para producir bioetanol a partir de una materia prima de plantas lignocelulósicas mediante separación de la celulosa, hemicelulosa y ligninas contenidas en ella. Se procede a la hidrólisis enzimática de dicho material y a la fermentación de los productos obtenidos (ver página 5, línea 26 - página 6, línea 31).

El documento D04 divulga un método de obtención de combustibles mediante conversión de la biomasa que comprende tres fases: oxidación parcial por zonas, producción de alcohol y reforma del gas (ver página 1, resumen).

El documento D05 divulga un procedimiento para producir ácido acético a partir de lignocelulosa en una fermentación empleando *Clostridium thermoaceticum* como microorganismo anaeróbico en presencia de cisteína clorhidrato monohidrato; y un segundo método para obtener bioetanol a partir del ácido acético obtenido en el primer método (ver página 1, resumen; página 6, reivindicaciones 1, 9).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente solicitud es un bioproceso para producir bioetanol sin acumulación de ácido acético al final de la conversión, empleando un sustrato con monóxido de carbono alimentado en continuo a un biorreactor inoculado con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum*, añadiendo tungsteno (W) al medio y ajustando el pH durante la fermentación.

1.1. REIVINDICACIONES 1-6

El uso de bacterias acidogénicas en procesos de conversión para obtención de bioetanol es conocido en el estado de la técnica. Los documentos D01 y D02 anticipan el uso de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* para este fin y condiciones para aumentar el rendimiento de la fermentación, entre las que se encuentra el control del pH.

Sin embargo, no se ha encontrado ningún documento en el estado de la técnica que divulgue un procedimiento que incluya la adición de tungsteno al medio de cultivo con la finalidad de incrementar la producción de bioetanol, disminuyendo al tiempo la concentración de ácido acético producido.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-6 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D01 - D05 se refieren al estado de la técnica y no son relevantes en relación a la novedad y actividad inventiva del objeto de la invención.