

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 161**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/16** (2006.01)

**C12P 7/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13705480 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016** **EP 2817411**

54 Título: **Método biotecnológico para producir butanol y ácido butírico**

30 Prioridad:

**22.02.2012 EP 12156493**

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

**31.03.2016**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Strasse 1- 11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHIEMANN, YVONNE;  
REINECKE, LIV;  
HAAS, THOMAS;  
WEUSTER-BOTZ, DIRK;  
KRISPIN, MONIKA JOHANNA y  
KRISPIN, WILHELM**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 565 161 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

Método biotecnológico para producir butanol y ácido butírico

5 El presente invento se refiere a un método para producir unas entidades químicas de C4, de manera preferida ácido butírico y/o butanol, que comprende las etapas de poner en contacto una célula bacteriana acetogénica en un medio acuoso con un gas de síntesis, y de incubar la mezcla obtenida en la etapa a) a una temperatura comprendida entre 0 y 100 °C durante por lo menos 30 minutos, en donde el medio acuoso comprende, en la etapa b), etanol y/o acetato en una concentración combinada total de por lo menos 0,1 g l<sup>-1</sup>.

10 La era de los combustibles fósiles no renovables está llegando a su fin. Mientras que los profesionales químicos han sido capaces hasta ahora de confiar en un suministro virtualmente ilimitado de carbón, petróleo y gas natural, la disponibilidad de tales recursos, formados por bacterias, plancton, plantas y materia animal, que se han enterrado en sedimentos oceánicos a lo largo de millones de años, está sentenciada a ser limitada en un futuro muy cercano.

15 Además de esto, el hecho de quemar combustibles fósiles ha estado vinculado con el aumento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y con unos cambios climáticos asociados, de manera sumamente notable con el calentamiento global. Por lo tanto, la próxima generación de procedimientos para la producción de productos químicos a granel tales como butanol, ácido butírico y derivados de éstos, que se derivan convencionalmente de los recursos fósiles, tendrá que partir de unos recursos renovables, es decir de unos materiales que sean renovables de una manera fácil y, en el marco de unas escalas de tiempo geológicas, rápida.

20 La biotecnología industrial, es decir la aplicación de unos biocatalizadores tales como unas enzimas o unos organismos que son catalíticamente competentes como catalizadores industriales, ofrece unas alternativas a muchos procedimientos convencionales que usan unos recursos fósiles como materiales de partida. Los biocatalizadores no solamente son capaces de convertir a unos compuestos preparados a partir de unos materiales renovables, que son frecuentemente unos productos de desecho agrícolas o de procesos, que de otro modo tendrían que ser desechados, sino que ellos no requieren el uso de unos compuestos tóxicos y, no en último término, reducen las emisiones de gases con un efecto de invernadero, en comparación con los enfoques convencionales.

25 En la técnica anterior se ha informado acerca de numerosos métodos para producir butanol (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH) y ácido butírico (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH, al que también se hace referencia como butirato), y unos derivados de C4 (es decir con 4 átomos de carbono) de éstos, pero la mayor parte de éstos confían en craquear a los combustibles fósiles y en oxidar a los resultantes hidrocarburos de cadena corta. En contraste con esto, se han descrito pocos procedimientos que partan del carbono en la forma de monóxido de carbono o de dióxido de carbono, unos compuestos que están disponibles a partir de gases de escape y, por ejemplo, de un gas de síntesis. Chen y colaboradores (1999) divulgan el uso de glucosa para la producción de disolventes.

35 Un gas de síntesis, que es un concepto que se refiere a diversas mezclas que comprenden por lo menos un producto escogido entre agua e hidrógeno, y por lo menos un producto escogido entre monóxido de carbono y dióxido de carbono, es una fuente renovable de carbono, y está fácilmente disponible a lo largo de todo el mundo, puesto que se conocen unos procedimientos para su producción que usan diversos materiales de partida, que incluyen reformar con vapor de agua un gas natural o unos hidrocarburos líquidos, y la gasificación de carbón o de una biomasa.

40 El uso de un gas de síntesis para la producción de unos compuestos que comprenden cadenas de carbono, ha sido informado en la técnica anterior. Sin embargo, los procedimientos que se han descrito con anterioridad dependen de la adición de unos substratos adicionales, en particular de unos hidratos de carbono tales como glucosa. Unos procedimientos que están basados en el consumo microbiano de un gas de síntesis como una fuente de carbono conducen a unos rendimientos bastante insatisfactorios de los compuestos deseados.

45 Por lo tanto, el problema que constituye el fundamento del presente invento consiste en proporcionar un método para producir unas entidades químicas de C4, que se escogen entre butanol y/o ácido butírico, partiendo de un gas de síntesis.

50 Otro problema que constituye el fundamento del presente invento consiste en proporcionar un método para producir unas entidades químicas de C4 partiendo de un gas de síntesis, en el que se mejore el rendimiento de estos productos de C4, en relación con los reaccionantes que contienen carbono, distintos del monóxido de carbono y del dióxido de carbono, es decir que se reduzca la cantidad de compuestos de carbono distintos del monóxido de carbono y del dióxido de carbono, requerida para la síntesis .

55 En un primer aspecto, el problema que constituye el fundamento del presente invento se resuelve mediante un método para producir unas entidades químicas de C4, de manera preferida ácido butírico y/o butanol, que comprende las siguientes etapas:

60

65

- 5 a) poner en contacto una célula bacteriana acetogénica en un medio acuoso con un gas de síntesis en condiciones anaeróbicas,
- b) incubar la mezcla obtenida en la etapa a) a una temperatura comprendida entre 0 y 100 °C durante por lo menos 30 minutos,

10 en donde el medio acuoso comprende, en la etapa b), etanol y/o acetato en una concentración combinada total que excede de 0,1 g l<sup>-1</sup>, en donde el etanol y/o el acetato es o son un etanol y/o un acetato que se han producido exógenamente.

15 En una primera forma de realización del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que la concentración combinada total de etanol y/o acetato es de 0,5 g l<sup>-1</sup> a 20 g l<sup>-1</sup>.

En una segunda forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de la primera forma de realización del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el gas de síntesis comprende de 40 a 100 %, de manera preferida de 40 a 95 % de CO.

20 En una tercera forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta segunda del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el gas de síntesis comprende menos que 10 % de CO<sub>2</sub>.

25 En una cuarta forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta tercera del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el gas de síntesis comprende menos que 10 % de CO.

En una quinta forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta cuarta del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el método comprende la etapa de

- 30 c) separar y, opcionalmente, reciclar etanol y/o acetato a partir de la mezcla que se ha obtenido después de la etapa b).

35 En una sexta forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta quinta del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método, en el que la célula bacteriana acetogénica se escoge entre el conjunto que se compone de *Clostridium*, *Moorella* y *Carboxythermus* y de manera preferida es la *Clostridium carboxidivorans*.

40 En una séptima forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta sexta del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el valor del pH en las etapas a) y b) se mantiene entre 3 y 7, de manera preferida es de 4 a 6, y de manera más preferida es de 5 a 5,5.

45 En una octava forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta séptima del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 °C y 45 °C, de manera preferida de 30 °C hasta 40 °C.

50 En una novena forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta octava del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el gas de síntesis proporciona más de un 80 %, de manera preferida más de un 90 %, del carbono que está presente inicialmente en la etapa a).

55 En una décima forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta novena del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un método en el que el procedimiento se realiza de un modo continuo.

60 En una undécima forma de realización del primer aspecto, que es también una forma de realización de las formas de realización primera hasta décima del primer aspecto, en la que la etapa b) se lleva a cabo en la ausencia de hidratos de carbono.

65 El problema que constituye el fundamento del presente invento se resuelve, en un segundo aspecto, mediante una el uso de etanol y/o acetato para aumentar la proporción del gas de síntesis que ha sido convertido por una célula bacteriana acetogénica en unas entidades químicas de C<sub>4</sub>, de manera preferida ácido butírico y/o butanol, en el que el etanol y/o el acetato es, o son, un etanol y/o un acetato que se ha(n) producido exógenamente, y de manera preferida se añade(n) a un medio acuoso que comprende la célula bacteriana acetogénica, antes de la acumulación de unas cantidades detectables del etanol y/o del acetato que se ha(n) producido endógenamente por dicha célula.

En una primera forma de realización del segundo aspecto, el problema se resuelve mediante un método, en el que el acetato y/o el etanol está(n) presente(s) en un medio acuoso que comprende la célula bacteriana acetogénica en una concentración combinada total de etanol y/o de acetato que excede de 0,5 g l<sup>-1</sup>, pero no de 20 g l<sup>-1</sup>.

En una segunda forma de realización del segundo aspecto, que es también una forma de realización de la primera forma de realización del segundo aspecto, el problema se resuelve mediante un uso, en el que la célula bacteriana acetogénica se escoge entre el conjunto que se compone de *Clostridium*, *Moorella* y *Carboxythermus* y de manera preferida es la *Clostridium carboxidivorans*.

Sin querer estar vinculados a ninguna teoría, los autores del presente invento han establecido la teoría de que la presencia de etanol o acetato induce una expresión de unos genes que son esenciales para la conversión de un gas de síntesis en unas entidades químicas de C<sub>4</sub>, de manera preferida en butanol y/o ácido butírico, aumentando de esta manera la capacidad de una célula bacteriana acetogénica para metabolizar al monóxido de carbono y al dióxido de carbono procedentes de un gas de síntesis.

El presente invento se centra en torno a la producción de unas entidades químicas de C<sub>4</sub>, de manera preferida de butanol y/o ácido butírico, usando una célula bacteriana acetogénica. En una forma preferida de realización, el concepto de "célula bacteriana acetogénica", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una célula de bacteria o arquea, que es capaz de producir el acetato en unas condiciones anaeróbicas, de manera preferida usando hidrógeno como un donante de electrones y dióxido de carbono como un aceptor de electrones o monóxido de carbono en lugar de dióxido de carbono. En la técnica anterior se ha divulgado una multitud de bacterias acetogénicas, que incluyen, pero no se restringen a, *Clostridium aceticum* (Wieringa, K. T. (1936), J. Microbiol. Serol. 3, 263-273), *Acetobacterium woodi* (Balch, W. E., Schobert, S., Tanner, R. S., y Wolfe, R. S. (1977), Int. J. Sys. Bacteriol. 27, 335-361), *Clostridium thermacetivum* (Fontaine, F. E., Peterson, W. H., McCoy, E. y Johnson, M. J. (1942), J. Bact. 43, 701-715), *Clostridium lungdahlii* (documento de solicitud de patente internacional WO0068407), *Clostridium autoethanogenum* (Aribini y colaboradores, Archives of Microbiology 161, 345-351), *Moorella* sp. HUC22-1 (Sakai y colaboradores, Biotechnology Letters 29, 1697-1612) y las del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny y colaboradores (1991), Systematic and Applied Microbiology 14, 254-260). Estas y otras células bacterianas acetogénicas están disponibles comercialmente, por ejemplo, a partir de la American Tissue and Culture Collection (ATTC) ((Colección norteamericana de tejidos y cultivos), EE.UU., o de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) GmbH, Braunschweig, Alemania. Por lo tanto, dentro del alcance del presente invento se encuentra el uso de un cultivo mixto que comprende por lo menos dos células bacterianas acetogénicas.

El concepto de "entidad química de C<sub>4</sub>", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a butanol o butirato o a un derivado que se ha obtenido mediante una derivatización que implica cualquier reacción distinta de las reacciones que implican una "adición o retirada neta" de átomos de carbono, para dar butanol o butirato, que incluyen, pero no están restringidas a, una oxidación, en particular a una hidroxilación, a una reducción, y a unos desplazamientos de grupos metilo, en donde el concepto de "adición o retirada neta de átomos de carbono" no excluye a una adición o retirada provisional de átomos de carbono, por ejemplo, atar a la entidad química de C<sub>4</sub> o de su derivado, de una manera provisional, a una enzima o a un cofactor de ésta. Unas entidades químicas de C<sub>4</sub> son 1-butanol (al que se hace referencia en esta solicitud como "butanol"), 2-butanol, el ion butirato (o ácido butírico), 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, aminobutano, tiobutanol, isobutanol e isobutanol.

El presente invento considera el uso tanto de unas células bacterianas acetogénicas de tipo silvestre como de unas células bacterianas acetogénicas modificadas genéticamente. En una forma preferida de realización, una célula bacteriana acetogénica modificada genéticamente es una célula bacteriana acetogénica que ha sido modificada de tal manera que la actividad de por lo menos una enzima que está implicada en la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl, es decir la ruta metabólica que transforma en acetato al monóxido de carbono, al dióxido de carbono y al hidrógeno. En una forma preferida de realización, el concepto de "una enzima que participa en la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl", tal como se usa en el presente contexto, comprende cualquier enzima que se fija o que, de manera preferida, acepta como un sustrato, a uno de los sustratos de dicha ruta metabólica, de manera preferida monóxido de carbono, dióxido de carbono o hidrógeno, o a uno cualquiera de los compuestos intermedios que se han formado en esta ruta metabólica a partir de uno cualquiera de estos sustratos, cuando los sustratos se convierten en acetato o en unos derivados de éste. En otra forma preferida de realización, el concepto de "una enzima que participa en la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una enzima tomada del conjunto que se compone de CO deshidrogenasa y de acetil-CoA sintetasa (Diekert y Wohlfahrt (1994), Antonie van Leeuwenhoek 66 (1-3), 209-221). Unas técnicas que se pueden usar para modificar genéticamente a las células bacterianas se han descrito en la técnica anterior, por ejemplo, en la obra de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press), así como unos métodos para aumentar la actividad de una enzima en una célula bacteriana, por ejemplo, aumentando la expresión del gen que codifica la enzima que tiene la actividad interesante, por intermedio de una amplificación del gen cromosómico (véanse los documentos WO 03/014330 y WO 03/040373). En una forma preferida de realización, la célula bacteriana acetogénica se escoge entre el conjunto que se compone de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei* y *Clostridium ljungdahlii*.

Es esencial que el procedimiento se lleve a cabo en condiciones anaeróbicas. En una forma preferida de realización, el concepto de "condiciones anaeróbicas", tal como se usa en el presente contexto, significa que la saturación con oxígeno en una solución interesante es, en un orden de preferencia creciente, una saturación de menos que 30, 20, 10, 5, 2,5 o 1 por ciento, en donde una saturación de 100 % representa a la concentración de oxígeno que está presente si la solución es rociada extensamente con oxígeno gaseoso puro en unas condiciones comparables, por ejemplo a 20 °C bajo la presión atmosférica. Con respecto a un gas, el concepto de "condiciones anaeróbicas", tal como se usa en el presente contexto, significa que, en una forma preferida de realización, el gas comprende, en un orden de preferencia creciente y con referencia al volumen total, menos que 30, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 0,1, 0,01 % de oxígeno. En otra forma preferida de realización, el concepto de "condiciones anaeróbicas", tal como se usa en el presente contexto, significa que la concentración de oxígeno, bien sea en una mezcla gaseosa o en una solución, es tan alta que no inhibe al crecimiento de unas bacterias acetogénicas anaeróbicas, de manera preferida a la *Clostridium carboxidivorans*. Un experto en la especialidad está familiarizado con unas técnicas que se pueden usar para hacer anaeróbicos/as a los recipientes de reacción y a las soluciones, por ejemplo barriendo con nitrógeno, argón o similares a un recipiente estanco a los gases y a unas soluciones, o complementando unas soluciones acuosas con unos sistemas enzimáticos que consumen oxígeno, por ejemplo 0,6 % (p/v = peso/volumen) de β-D-glucosa, 0,5 unidades ml<sup>-1</sup> de glucosa oxidasa (de Sigma) y 200 unidades ml<sup>-1</sup> de catalasa (de Sigma) tal como ha sido descrito por Richter, C. D. y colaboradores (2002), J. Biol. Chem. 277 (5), 3.094-3.100.

Un gas de síntesis es la fuente principal de carbono para producir de acuerdo con el invento unas entidades químicas de C4, de manera preferida butanol y/o ácido butírico. El concepto de "gas de síntesis", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una mezcla que comprende por lo menos un producto químico escogido entre agua e hidrógeno (H<sub>2</sub>) y por lo menos monóxido de carbono (CO) y opcionalmente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), en la que el volumen combinado total de agua, hidrógeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono es por lo menos de 80, de manera preferida por lo menos de 90 por ciento del volumen total de la mezcla. Otros componentes comprenden nitrógeno, gases nobles y similares. En una forma preferida de realización, el gas de síntesis comprende de 40 a 95% de monóxido de carbono. En una forma preferida de realización el gas de síntesis comprende de 40 a 100, de manera preferida de 40 a 95 % de dióxido de carbono y de 0,5 a 20 % de H<sub>2</sub>. En otra forma preferida de realización, el gas de síntesis comprende menos que 10 % de dióxido de carbono. En otra forma preferida de realización, el gas de síntesis comprende menos que 10 % de monóxido de carbono. En otra forma preferida de realización, el gas de síntesis comprende por lo menos 5, preferiblemente 10 % de monóxido de carbono. En otra forma preferida de realización, el volumen combinado total de hidrógeno y de dióxido de carbono es, en un orden de preferencia creciente, de más que 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento del volumen total de la mezcla. En una forma preferida de realización, el concepto de "poner en contacto" a un microorganismo con un "gas de síntesis" que tiene cualquier composición especificada en este invento, tal como se usa en el presente contexto, significa que el microorganismo está presente en una atmósfera que se compone de un gas de síntesis con la composición especificada.

De acuerdo con el método del invento, la célula bacteriana acetogénica se pone en contacto con un gas de síntesis en un medio acuoso, en la ausencia de oxígeno. En una forma preferida de realización, el concepto de "medio acuoso" comprende cualquier solución acuosa que comprenda las cantidades de sales y tampones que se necesitan para hacer crecer o mantener viva a una célula bacteriana acetogénica, y para mantener la acetogénesis. Por ejemplo, un medio acuoso de acuerdo con Hurst, K. M., y Lewis, R. (2010), Biochemical Engineering Journal 2010, 48, 159-165 se puede usar para llevar a cabo las enseñanzas del invento. En una forma preferida de realización, el medio acuoso comprende un extracto de levadura.

Un aspecto crucial del presente invento es que el etanol (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH) y/o el acetato (CH<sub>3</sub>-COO<sup>-</sup>) está(n) presente(s) en el medio acuoso desde el comienzo de la reacción en una concentración combinada total, es decir, que la suma de la concentración del catión de acetato y de la concentración de etanol, es de por lo menos 0,1 g l<sup>-1</sup>. En otras formas preferidas de realización, la concentración de etanol y/o etanol es de 0,1 a 50, de 0,2 a 40, de 0,25 a 20 o de 0,5 a 20 g l<sup>-1</sup>.

En vez de esperar a que la célula produzca un acetato endógeno, en la etapa a), en el medio acuoso está(n) presente(s) inicialmente un acetato y/o un etanol producido(s) exógenamente. En una forma preferida de realización, el concepto de "un acetato y/o un etanol producido(s) exógenamente", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un acetato o a un etanol producido o purificado en un recipiente de reacción separado antes de entrar en contacto con una célula bacteriana acetogénica, en contraste con el acetato y/o el etanol que se produce(n) en la etapa b), es decir después de la etapa a). En una forma preferida de realización, el concepto de un acetato y/o un etanol "producido(s) exógenamente", comprende un acetato y/o un etanol producido(s) por una célula bacteriana acetogénica o, de hecho, por la misma célula bacteriana acetogénica que se ha usado en la etapa a), pero retirada desde el recipiente de reacción, separada de cualquier entidad química de C4 producida y reciclada. En una forma preferida de realización, la concentración del acetato y/o del etanol producido(s) exógenamente se mantiene en el medio acuoso en el valor o en el intervalo de valores que está presente inicialmente, siempre y cuando que continúe la reacción catalizada por la célula bacteriana acetogénica en la etapa b). En una forma preferida de realización, el acetato y/o el etanol en el medio acuoso global se considera(n) como exógeno(s) siempre y cuando que más de un 80, de manera preferida más de un 90 %, del acetato y/o del etanol total(es) presente(s) en el medio acuoso proceda del acetato y/o del etanol producido(s) exógenamente.

La mezcla obtenida en la etapa a) puede ser incubada durante por lo menos 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 120 o 160 horas. En una forma preferida de realización, en la etapa b) está presente un agente reductor. Un experto en la especialidad está familiarizado con unos agentes reductores, por ejemplo con unos agentes que contienen grupos de tiol, tales como cisteína o ditionito. La concentración inicial puede ser de por lo menos 0,1, 0,5, 1, 2, 5 o 10 mM.

Se prefiere que el método comprenda reciclar etanol y/o acetato a partir de la mezcla resultante después de la etapa b). En una forma preferida de realización, esto significa que alguna cantidad de la mezcla de reacción procedente de la etapa b) se retira y que el acetato y/o el etanol allí presente(s) se separa(n) respecto de cualquier entidad química de C4 que se haya formado, seguido por transferir de retorno a la mezcla de reacción el acetato y/o el etanol obtenido(s) de esta manera. Alguna cantidad de la mezcla de reacción puede ser retirada en la etapa b) de un modo discontinuo (por tandas) o, de manera preferida, de un modo continuo. En el último caso, la mezcla de reacción que se ha retirado continuamente puede ser recogida antes de la etapa de separación.

Un experto en la especialidad está familiarizado con unos métodos que se pueden usar para separar el acetato y/o el etanol con respecto de cualquier cantidad de butanol y/o ácido butírico que está presente en una solución acuosa, por ejemplo una extracción usando un disolvente orgánico hidrófobo, una destilación o algo similar.

Cualquier compuesto orgánico al que se hace referencia en este invento, por ejemplo, unas entidades químicas de C4, acetato, etanol, butirato y butanol, comprende tanto las formas protonadas del compuesto interesante así como también las diversas sales del compuesto. Por ejemplo, el concepto de acetato puede comprender tanto ácido acético ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ), así como también las diversas sales de ácido acético, por ejemplo, acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{-COO}^- \text{Na}^+$ ), acetato de potasio ( $\text{CH}_3\text{-COO}^- \text{K}^+$ ), acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{-COO}^- \text{NH}_4^+$ ) o unas sales similares.

En una forma preferida de realización del presente invento, este invento se lleva a cabo de un modo continuo, en el que las soluciones acuosas se retiran continuamente desde el recipiente que se ha usado para llevar a cabo las etapas a) y b), se separan en una fracción enriquecida con entidades químicas de C4, de manera preferida con butanol y/o ácido butírico, y otra fracción enriquecida con acetato y/o etanol, y esta última fracción se añade al recipiente que se ha usado para llevar a cabo las etapas a) y b).

La temperatura en las etapas a) y b) se tiene que escoger tomando en cuenta las necesidades de la célula bacteriana acetogénica, por una parte, y los parámetros termodinámicos, por otra parte. El estado de la técnica enseña unos intervalos de temperaturas así como unas temperaturas óptimas para una enorme gama de bacterias acetogénicas. Por ejemplo, la *Clostridium thermoaceticum* puede ser incubada a unas temperaturas de hasta 60 °C (Fontaine y colaboradores, 1942). Véanse también los libros de texto clásicos de microbiología, en lo referente a las temperaturas que se pueden usar para hacer crecer células de bacterias acetogénicas y arqueas, por ejemplo Dworkin y colaboradores (2006) *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria* [Los procariotas, un manual sobre la biología de las bacterias], tomo 2. En una forma preferida de realización, la temperatura aplicada en la etapa b) es de 0 a 100 °C, de 10 a 80 °C, de 20 a 60 °C y de 30 a 45 °C. En una forma preferida de realización, la presión aplicada del gas de síntesis es de 0,5 a 10 bares, de manera más preferida de 0,8 a 8, de manera todavía más preferida de 1,5 a 6 bares. En otra forma preferida de realización, la presión aplicada es superior a la presión atmosférica. En otra forma preferida de realización, la presión es de más que 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 bares. En una forma preferida de realización, la presión aplicada es superior a la presión atmosférica. En una forma preferida de realización, la unidad de "presión manométrica" (en inglés "gauge pressure"), tal como se menciona en el presente contexto, se refiere a la presión relativa a la presión atmosférica local o del medio ambiente. Por ejemplo, si la presión atmosférica local es de 1 bar y la presión en el interior de un recipiente es de 1,8 bares, luego la presión manométrica es de 0,8 bares (de presión manométrica).

Constituye un punto fuerte del presente invento el hecho de que la formación de unas entidades químicas de C4, de manera preferida butanol y/o ácido butírico, no depende de la presencia de unas cantidades significativas de unos compuestos orgánicos que comprenden cadenas de carbonos con más de dos átomos de carbono. En una forma preferida de realización, las etapas a) y b) pueden, pero no tienen forzosamente que, llevarse a cabo en la ausencia de hidratos de carbono. En una forma preferida de realización, el concepto de "en la ausencia de hidratos de carbono" significa que la concentración de hidratos de carbono es, en un orden de preferencia creciente, menor que 5, 1, 0,5, 0,1 o 0,05 % (en peso por volumen). En una forma preferida de realización, el concepto de "hidratos de carbono" comprende cualquier compuesto orgánico que tiene por lo menos dos grupos funcionales que se escogen entre el conjunto que comprende grupos hidroxilo, aldehído o ceto, y que comprende una cadena lineal de carbonos con cinco o más átomos de carbono. Unos hidratos de carbono ejemplificativos comprenden unas hexosas tales como glucosa o fructosa, unas pentosas tales como ribulosa, y unos azúcares complejos que comprenden dos o más monómeros de hidratos de carbono, por ejemplo sacarosa.

De manera similar, se prefiere que el gas de síntesis, en un orden de preferencia creciente, proporcione más de 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % del carbono que está presente inicialmente en la etapa a). En una forma preferida de realización, el concepto de "el gas de síntesis proporciona más de X % del carbono presente inicialmente en la etapa a)", tal como se usa en este contexto, significa que más de X % de los átomos de carbono que están presentes en el

recipiente de reacción son unos átomos de carbono que están contenidos en unas moléculas de monóxido de carbono o de dióxido de carbono. Por ejemplo, el gas de síntesis proporciona más de un 90 % del carbono presente si están presentes 9 moles de dióxido de carbono, menos de 1 mol de metano y alguna cantidad de hidrógeno, pero nada de otros cuerpos que comprenden por lo menos un átomo de carbono.

El procedimiento se puede llevar a cabo en un modo por tandas. En el presente contexto, el concepto de "incubar la mezcla... durante por lo menos X minutos" significa, tal como se usa en este contexto, en una forma preferida de realización, que una tanda de células de bacterias acetogénicas se mantiene durante X minutos en las condiciones especificadas, por ejemplo en la presencia de un medio acuoso, en la presencia de un gas de síntesis que está en contacto con la célula bacteriana acetogénica, la temperatura que se ajuste, en la presencia de etanol y/o acetato, y así sucesivamente. De manera alternativa, el procedimiento se puede llevar a cabo en un modo continuo. Si éste es el caso, el concepto de "incubar la mezcla... durante por lo menos X minutos" significa, tal como se usa en este contexto, en una forma preferida de realización, que el período de tiempo promedio consumido por una molécula de un reaccionante, por ejemplo de hidrógeno, en el recipiente o en las condiciones especificadas es de X minutos. Por ejemplo, si un recipiente estanco a los gases comprende 10 litros de hidrógeno, el hidrógeno se añade en un caudal (una velocidad de flujo) de 1 litro por minuto, y si la construcción del recipiente es tal que se pueda presuponer que las moléculas de hidrógeno abandonan el recipiente en el orden de entrada, entonces el período de tiempo promedio consumido, en otras palabras el período de tiempo que la molécula de hidrógeno consume incubada en las condiciones establecidas en el recipiente, es de 10 minutos.

Si está previsto realizar un procedimiento a gran escala técnica, puede ser ventajoso llevar a cabo las enseñanzas del invento en un modo continuo. En una forma preferida de realización, el concepto de "modo continuo", tal como se usa en este contexto, se refiere a un método que comprende una alimentación continua del sustrato en el biorreactor y una retirada de un medio que comprende unos productos desde el biorreactor. El modo continuo puede comprender adicionalmente una alimentación constante de nutrientes. Las células en el biorreactor pueden crecer, y alternativamente, los nutrientes pueden ser limitados al efecto de que las células alcancen una fase estacionaria, es decir que el crecimiento está limitado por la carencia de nutrientes, pero las células permanecen metabólicamente activas y mantienen en conversión a unos sustratos tales como un gas de síntesis. En una forma preferida de realización, el concepto de "fase estacionaria", tal como se usa en este contexto, significa que las células que están siendo sometidas a la acción de esa fase son metabólicamente activas pero esencialmente no se multiplican ni reproducen.

El invento se puede llevar a cabo usando cualquier tipo de recipiente que permita el mantenimiento de unas condiciones anaeróbicas. Si se lleva a cabo a una pequeña escala, entonces se puede usar un guante estanco a los gases que proporciona un entorno bajo en oxígeno o exento de oxígeno. A una gran escala, un fermentador de gas de síntesis de alto volumen manifiesta ser más práctico. En una forma preferida de realización, la mezcla de reacción se somete a una agitación constante para asegurarse de que las células, los nutrientes, los sustratos y los productos están siendo distribuidos uniformemente a lo largo del medio acuoso.

Unas herramientas analíticas de acuerdo con el estado de la técnica permiten la vigilancia constante de los numerosos compuestos en un biorreactor, por ejemplo, tomando regularmente muestras de la mezcla de reacción y sometiéndolas a un análisis por HPLC (= cromatografía de fase líquida de alto rendimiento). Unos parámetros claves tales como el valor del pH y la concentración de los sustratos y de los productos se pueden ajustar "on line" en caso de ser necesario. En una forma preferida de realización, la concentración de por lo menos un compuesto escogido entre etanol y butanol se mantiene bajo una vigilancia constante y sus niveles son ajustados a unas concentraciones que son compatibles con el crecimiento y con la actividad catalítica de la célula bacteriana acetogénica usada.

El invento se ilustra aún más mediante las siguientes Figuras y Ejemplos.

La **Fig. 1** muestra la diferencia entre las concentraciones de los productos al comienzo y al final de la cultivación, referidas al contenido de carbono obtenido en el Ejemplo 1. La unidad "mmolC/l" se refiere a la cantidad de carbono en milimoles por litro.

La **Fig. 2** muestra la diferencia entre las concentraciones de los productos al comienzo y al final de la cultivación, referidas al contenido de carbono obtenido en el Ejemplo 2. La unidad "mmolC/l" se refiere a la cantidad de carbono en milimoles por litro.

La **Fig. 3** muestra las cantidades de los productos al comienzo y al final del cultivo referidas al contenido de carbono obtenido en el Ejemplo 3 usando la cepa *Clostridium drakei*.

La **Fig. 4** muestra la diferencia entre las concentraciones de los productos al comienzo y al final de la cultivación referidas al contenido de carbono obtenido en el Ejemplo 3 usando la cepa *Clostridium ljungdahlii*.

**Ejemplo 1: Preparación de ácido butírico en la ausencia o presencia de etanol**

Un cultivo previo de *Clostridium carboxidivorans* DSN 15243 se hizo crecer en unas botellas anaeróbicas con una capacidad de 1 l cerradas herméticamente usando un diafragma de caucho butílico, que comprende 200 ml de un medio PETC modificado de acuerdo con Hurst, K. M., y Lewis, R. (2010), Biochemical Engineering Journal 2010, 48, 159-165, que se compone de 1 g de un extracto de levadura, 19 g de un MES, 30 ml de una solución de sales inorgánicas, 10 ml de una solución de elementos traza y 10 ml de una solución de vitaminas. La solución de sales inorgánicas comprende 80 g de NaCl, 100 g de cloruro de amonio, 10 g de cloruro de potasio, 10 g de monofosfato de potasio, 20 g sulfato de magnesio y 4 g de cloruro de calcio por litro. La solución de vitaminas se compone de 0,01 g de piridoxina, 0,005 g de tiamina, 0,005 g de riboflavina, 0,005 g de pantotenato de calcio, 0,005 g de ácido tióctico, 0,005 g de ácido p-aminobenzoico, 0,005 g de ácido nicotínico, 0,005 de vitamina B12, 0,002 g de ácido fólico y 0,01 g de MESNA por litro. La solución de elementos traza se compone de 2 g de ácido nitriloacético, 1 g de MnSO<sub>4</sub>, 0,8 g de sulfato de amonio y hierro, 0,2 g de cloruro de cobalto, 0,2 g de sulfato de zinc, 0,02 g de cloruro de cobre(II), 0,02 g de cloruro de níquel, 0,02 g de molibdato de sodio, 0,02 g de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 0,02 de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> por litro. El valor del pH se ajustó a 5,9.

Antes de la inoculación, el medio se hirvió durante 20 minutos y a continuación se barrió con nitrógeno puro durante 20 minutos. A continuación, él se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos, seguido por un enfriamiento, luego se rellenó usando un gas de proceso que comprendía 50 % de CO, 45 % de H<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> a una presión manométrica de 1 bar. A continuación, la presión se ajustó a una presión manométrica de 0,8 bares.

También, antes de la inoculación, se añadieron 1,5 ml de una solución que comprendía en cada caso 4 % de sulfato de sodio e hidrocloreuro de cisteína como agente reductor en unas condiciones anaeróbicas estériles.

El cultivo se hizo crecer a 37 °C y 100 rpm. El cultivo se transfirió a un medio fresco (de nueva aportación) una vez cada 72 horas.

Para los experimentos, el medio se preparó de la misma manera usando un gas de proceso que comprendía 95 % de CO y 5 % de CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, se añadieron 0,6 g por litro de etanol a la mitad de los matraces en condiciones anaeróbicas estériles.

Las soluciones se incubaron en unas condiciones anaeróbicas estériles usando 10 % en volumen de un inóculo procedente de un cultivo realizado durante 48 horas. Los matraces se sacudieron a 37 °C y a 100 rpm durante 160 horas. La biomasa seca y las concentraciones de los productos se determinaron al comienzo y al final del experimento.

Las concentraciones de ácido acético, etanol, ácido butírico y butanol se determinaron usando una HPLC. Una columna de Aminex HPX-87H se utilizó como una fase estacionaria. Como un agente eluyente se añadió ácido sulfúrico 5 mM en un caudal constante de 0,6 ml/min. La temperatura de la columna fue de 40 °C. El etanol y el butanol se detectaron usando un detector del índice de refracción. Se utilizó un detector de matriz de diodos en una longitud de onda de 210 nm para detectar el ácido acético y el ácido butírico. Las concentraciones de los compuestos se calcularon mediante una integración del pico usando unos diagramas de calibración del respectivo compuesto en unas concentraciones definidas.

La **Fig. 1** muestra la diferencia entre las concentraciones de los productos al comienzo y al final de la cultivación, referidas al contenido de carbono.

En la presencia de etanol se formaron 105 nmolC/l de ácido acético en comparación con los 97,17 mmolC/l formados en la ausencia de etanol. Se formaron 22,06 mmolC/l de ácido butírico en la presencia de etanol en comparación con los 13,57 mmolC/l formados en la ausencia de etanol, cuando se usaron unas cantidades iguales de la biomasa seca, más específicamente de 480 mg/l.

En resumen, la adición de etanol conduce a un aumento significativo de la cantidad formada de ácido butírico.

**Ejemplo 2: Producción de ácido butírico en la ausencia o presencia de un acetato**

El protocolo experimental que se siguió fue como se ha descrito en el Ejemplo 1, exceptuando el hecho de que se añadieron 2 g/l de ácido acético a la mitad del matraz en lugar de 0,6 g/l de etanol y de que la tanda del gas de síntesis usado contenía 50 % de monóxido de carbono y 50 % de hidrógeno.

La **Fig. 2** muestra la diferencia entre las concentraciones de los productos al comienzo y al final de la cultivación, referidas al contenido de carbono. En la presencia de acetato se formaron 42,13 nmolC/l de ácido butírico en comparación con los 26,43 mmolC/l que se formaron en la ausencia de acetato.

En resumen, la adición de acetato da lugar asimismo a un aumento de la cantidad formada de ácido butírico.

**Ejemplo 3: Producción de ácido butírico en la presencia de acetato o etanol usando unas cepas y unas mezclas gaseosas alternativas****Medios y soluciones que se usaron:**

5 ATCC 1754 modificado (medio mínimo PETC)

Sustancia	Cantidad	
MES	10,00	g/l

Solución	Cantidad	
Elementos traza	10	ml/l
Vitaminas 141	10	ml/l

Solución	Cantidad	
Fructosa 250 g/l	20	ml/l
Agente reductor ATCC	10	Mil

10 La sustancia se mezcló con vitaminas y elementos traza, y el volumen se ajustó con el valor del pH y una solución de NaOH usando agua desmineralizada (agua VE). A continuación, el valor del pH se ajustó a 6,0 usando una solución de NaOH, el medio se hirvió y se transfirió a unas botellas de vidrio resistentes a la presión que tenían una capacidad de 1 l. A continuación, el medio se enfrió sobre hielo y se roció usando N<sub>2</sub> con el fin de retirar cualquier cantidad de oxígeno remanente.

15 A continuación, el medio se autoclavó. Luego, el agente reductor se añadió al medio y el volumen se ajustó usando agua VE anaeróbica. El agente reductor se esterilizó por separado y se almacenó en condiciones anaeróbicas.

ATCC 1754 modificado (PETC)

Sustancia	Cantidad	
NH <sub>4</sub> Cl	1,00	g/l
KCl	0,10	g/l
MgO x 7 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,20	g/l
NaCl	0,80	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10	g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	20,00	mg/l
Resazurina	1,00	mg/l
Extracto de levadura	1,00	g/l
MES	20,00	g/l

Solución	Cantidad	
Elementos traza de ATCC 1754	10	ml/l
Vitaminas 141	10	ml/l

Solución	Cantidad	
Fructosa 250 g/l	20	ml/l
Agente reductor de ATCC	10	ml/l

20 La sustancia, las vitaminas y los elementos traza se mezclaron y el volumen se ajustó con el valor del pH y con una solución de NaOH usando agua desmineralizada (agua VE). A continuación, el valor del pH se ajustó a 6,0 usando una solución de NaOH, el medio se hirvió y se transfirió a unas botellas de vidrio resistentes a la presión que tenían una capacidad de 1 l. A continuación, el medio se enfrió sobre hielo y se roció usando N<sub>2</sub> con el fin de retirar todo el oxígeno remanente.

25 A continuación, el medio se autoclavó. Luego, el agente reductor se añadió al medio y el volumen se ajustó usando agua VE anaeróbica. El agente reductor se esterilizó por separado y se almacenó en condiciones anaeróbicas.

ATCC 1754 modificado (PETC modificado)

Sustancia	Cantidad	
Extracto de levadura	1,00	g/l
MES	10,00	g/l

Solución	Cantidad	
Elementos traza de ATCC 1754	10	ml/l
Vitaminas de PETC modificado	10	ml/l
Solución inorgánica de PETC modificado	30	ml/l

Solución	Cantidad	
Agente reductor de ATCC	7,5	ml/l

5 La sustancia, las vitaminas y los elementos traza se mezclaron y el volumen se ajustó al valor del pH y con una solución de NaOH usando agua desmineralizada (agua VE). A continuación, el valor del pH se ajustó a 6,0 usando una solución de NaOH, el medio se hirvió y se transfirió a unas botellas de vidrio resistentes a la presión que tenían una capacidad de 1 l. A continuación, el medio se enfrió sobre hielo y se roció usando N<sub>2</sub> con el fin de retirar todo el oxígeno remanente.

10 A continuación, el medio se autoclavó. Luego, el agente reductor se añadió al medio y el volumen se ajustó usando agua VE anaeróbica. El agente reductor se esterilizó por separado y se almacenó en unas condiciones anaeróbicas.

Elementos traza de ATCC 1754

Sustancia	Cantidad	
Ácido nitrilotriacético	2	g/l
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1	g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,8	g/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2	g/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g/l
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02	g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02	g/l
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02	g/l
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,02	g/l
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02	g/l

15 Ante todo, ácido nitrilotriacético se disolvió en 1 l de agua desmineralizada (agua VE), y el valor del pH se ajustó a 6,0 usando una solución de KOH. A continuación, se añadieron todos los otros productos químicos. La solución de los elementos traza se almacenó a 4 °C en la oscuridad.

Vitaminas 141

Sustancia	Cantidad	
Biotina	2	mg/l
Ácido fólico	2	mg/l
Piridoxina-HCl	10	mg/l
Tiamina-HCl x H <sub>2</sub> O	5	mg/l
Riboflavina	5	mg/l
Ácido nicotínico	5	mg/l
D-Pantotenato de Ca	5	mg/l
Vitamina B12	0,1	mg/l
Ácido p-amino-benzoico	5	mg/l
Ácido lipónico	5	mg/l

20 Las sustancias se disolvieron en 1 l de agua desmineralizada (agua VE) y se congelaron a -20 °C en unos tubos de Falcon estériles en porciones de 10 ml hasta su uso.

Solución inorgánica de PET modificado

Sustancia	Cantidad	
NaCl	80	g/l
NH <sub>4</sub> Cl	100	g/l
KCl	10	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	20	g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4	g/l

Las sustancias se disolvieron en 1 l de agua desmineralizada (agua VE). La solución inorgánica se almacenó a 4 °C en la oscuridad.

5 **Agente reductor de ATCC 1754**

Sustancia	Cantidad	
NaOH	9	g/l
L-cisteína x HCl	40	g/l
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	40	g/l

10 Ante todo, se disolvió NaOH en 1 l de agua desmineralizada (agua VE) y se hirvió. A continuación, la solución se transfirió a una botella de vidrio resistente a la presión que tenía una capacidad de 1 l y se roció usando N<sub>2</sub> mientras que se enfriaba sobre hielo. Las otras sustancias se añadieron a la mezcla de reacción mientras que la solución se enfriaba. A continuación, el agente reductor se autoclavó durante 20 minutos.

**Cepas usadas:**

COX-Cdr-001 (*Clostridium drakei*)

COX-Clj-001 (*Clostridium ljungdahlii*)

15 **Cultivos previos:**  
Las cepas usadas se transfirieron a unos cultivos previos usando unos cultivos criogénicos preparados inmediatamente (antes que los cultivos usando 4 ml de un cultivo en la fase exponencial y 1 ml de una solución de glicerol al 50 % para la conservación y el almacenamiento a -80 °C). Los cultivos previos consistían, cada uno de ellos, en 5 ml del medio ATCC 1754 modificado (PETC) y un inóculo fijado de las cepas. La densidad ideal del inóculo fue determinada en unos experimentos piloto para la respectiva cepa.

COX-CD-001: 0,1 % en 5 ml del medio

COX-Cluj-001: 10 % en 5 ml del medio

25 **Cultivos:**

50 ml de cada uno de cualquiera de los medios usados se transfirieron a unas botellas de vidrio resistentes a la presión, anaeróbicas (exentas de oxígeno) estériles, que tenían una capacidad de 250 ml, y se inocularon usando 10 % (5 ml) de las cepas usadas, que habían sido tomadas a partir de los cultivos previos recientemente preparados, con una antigüedad de 3 días.

30 Los matraces de cultivo se cerraron usando un tapón de caucho butílico estéril y una tapa de color rojo (que comprende tres conjuntos perforados). Unas agujas huecas (de la entidad Sterican, Ø 0,90 x 40 mm) perforaron a través de todos los tres conjuntos. Un manómetro para controlar la presión se conectó con una de las agujas huecas (idealmente la que estaba situada en el centro). Unas válvulas se conectaron con las otras agujas huecas, de tal manera que el gas añadido y el gas retirado desde el matraz de cultivo se pudieran controlar de manera independiente uno de otro.

Cada una de las cepas usadas se cultivó por duplicado para obtener unos resultados directamente reproducibles.

40 **Preparación de los cultivos:**

Antes de empezar con las cultivaciones reales, las botellas fueron rociadas, cada una de ellas, usando tres veces un gas de síntesis. Esto se realizó conectando con una de las válvulas un tubo para bombear gas dentro de la botella y con la otra válvula un tubo para dejar salir el gas retirado por debajo de la campana en paralelo con unas disposiciones de regulación.

45 Por apertura de la válvula con el tubo para añadir gas, el gas de síntesis fue bombeado dentro del matraz de cultivo hasta que la aguja del manómetro mostró un valor de la presión de 0,8 bares. A continuación, se cerró la válvula para añadir gas y se abrió la válvula para retirar gas hasta que la aguja mostró un valor de la presión de 0 bares. Este proceso se repitió tres veces para cada matraz de cultivo. Cuando se repitió el procedimiento por una cuarta vez, se mantuvo la presión en la botella, es decir que los cultivos fueron cubiertos con el gas de síntesis.

Las muestras de cultivos estaban entonces listas para la cultivación a 35 °C y 100 rpm (revoluciones por minuto) en un baño de agua oscilante.

55 **Toma de muestras**

Una o dos veces por día se retiró aproximadamente 1 ml del cultivo para determinar la densidad óptica a 600 nm (registrando el crecimiento de un cultivo).

60 Al principio y al final de los experimentos, dos muestras de 1,5 ml cada una se transfirieron a unos tubos de Eppendorf que tenían una capacidad de 2 ml y se usaron para el análisis por RMN (resonancia magnética nuclear).

**Adición de gas:**

5 En intervalos regulares (varias veces por día) se comprobó la presión en el interior del matraz de cultivo con el fin de asegurarse de que ella era constante. El crecimiento de los cultivos y su metabolismo consumieron cantidades variables del gas de síntesis. En el caso de que la presión descendiese, se añadió más cantidad de gas tal como se ha descrito más arriba. El mismo proceso se llevó a cabo si se retiraba gas desde el matraz de cultivo antes de tomar una muestra.

**Final del experimento:**

10 El experimento se terminó después de aproximadamente una semana rociando de una manera continua durante 10 minutos con nitrógeno a través de cada uno de los matraces de cultivo antes de retirar las agujas huecas para conseguir una seguridad aumentada. Los cultivos se transfirieron a unos tubos de Falcon estériles con una capacidad de 50 ml bajo una campana estéril y se centrifugaron durante 30 minutos a 4.500 g. Ya no había ninguna necesidad más de trabajar en unas condiciones anaeróbicas. Los sedimentos de células que se habían recuperado fueron desechados y los materiales sobrenadantes de los cultivos fueron transferidos a unas jeringas estériles que 15 tenían una capacidad de 50 ml bajo la campana estéril. Ellos se transfirieron a un nuevo tubo de Falcon estéril con una capacidad de 50 ml por intermedio de un filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$  y se congelaron a -20 °C como unas muestras de respaldo.

**Experimento 1: Cultivación usando un extracto de levadura y 0,6 g/l de etanol (BF-DM-12-COX-038)**

20 Los experimentos se llevaron a cabo usando un medio ATCC 1754 (PETC) modificado que comprendía 1 g/l de extracto de levadura. Además, se usaron 0,6 g/l de etanol como una fuente de carbono. La mezcla gaseosa usada contenía 30 % de CO<sub>2</sub> y 70 % de H<sub>2</sub>.

**Experimento 2: Cultivación usando un extracto de levadura y 2 g/l de ácido acético (BF-DM-12-COX-041)**

25 El experimento se llevó a cabo tal como se ha descrito en el experimento 1 exceptuando que al medio se le añadió ácido acético en lugar de etanol.

**Experimento 3: Cultivación usando un extracto de levadura (BF-DM-12-COX-042) (experimento comparativo)**

30 Para realizar una comparación directa, se utilizó el mismo medio sin la adición de etanol o de ácido acético. Los resultados se describen en las **Figs. 3 y 4**. En resumen, el efecto mostrado en el Ejemplo 1 se pudo reproducir usando unas mezclas gaseosas alternativas y otras cepas de bacterias acetogénicas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de unas entidades químicas de C4 escogidos entre el conjunto formado por ácido butírico, butanol y unos derivados de éstos, en el que el derivado es 2-butanol, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, aminobutano, tiobutanol, isobutenol o isobutanol, que comprende las etapas de
- 5 a) poner en contacto una célula bacteriana acetogénica en un medio acuoso con un gas de síntesis en condiciones anaeróbicas,
- 10 b) incubar la mezcla obtenida en la etapa a) a una temperatura comprendida entre 0 y 100 °C durante por lo menos 30 minutos,
- en donde el medio acuoso comprende, en la etapa b), etanol y/o acetato en una concentración combinada total de por lo menos 0,1 g l<sup>-1</sup>, en donde el etanol y/o el acetato es/son un etanol y/o un acetato que se ha(n) producido exógenamente.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración combinada total de etanol y/o acetato es de 0,5 a 20 g l<sup>-1</sup>.
- 20 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 2, en el que el gas de síntesis comprende de 40 a 100 % de CO.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3, en el que el gas de síntesis comprende menos que 10 % de CO<sub>2</sub>.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 2 ó 4, en el que el gas de síntesis comprende menos que 10 % de CO.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en el que el método comprende la etapa de
- 30 c) separar y, opcionalmente, reciclar etanol y/o acetato a partir de la mezcla obtenida después de la etapa b).
- 35 7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, en el que la célula bacteriana acetogénica se escoge entre el conjunto formado por Clostridium, Moorella y Carboxythermus.
8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 7, en el que en las etapas a) y b) el valor del pH se mantiene entre 3 y 7.
- 40 9. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 8, en el que la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 °C y 45 °C.
- 45 10. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 9, en el que el gas de síntesis proporciona más de un 80 % del carbono que estaba presente inicialmente en la etapa a).
11. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 10, en el que el procedimiento se realiza de un modo continuo.
- 50 12. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 11, en el que la etapa b) se lleva a cabo en la ausencia de hidratos de carbono.
13. Un uso de etanol y/o acetato para aumentar la proporción de un gas de síntesis que ha sido convertido por una célula bacteriana acetogénica en un medio acuoso en unas condiciones anaeróbicas para dar unas entidades químicas de C4 escogidas entre el conjunto formado por ácido butírico, butanol y unos derivados de éstos, en el que el derivado es 2-butanol, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, aminobutano, tiobutanol, isobutenol o isobutanol, y en el que el medio acuoso comprende etanol y/o acetato en una concentración combinada total de por lo menos 0,1 g l<sup>-1</sup> y el etanol y/o el acetato se producen exógenamente.
- 55 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el etanol y/o el acetato se añaden al medio acuoso antes de la acumulación de unas cantidades detectables de etanol y/o acetato producidos endógenamente por dicha célula.
- 60 15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 hasta 14, en el que el acetato y/o el etanol se presenta(n) en un medio acuoso que comprende la célula bacteriana acetogénica en una concentración combinada total de 0,5 a 5 g l<sup>-1</sup>.
- 65

16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 hasta 15, en el que la célula bacteriana acetogénica se escoge entre el conjunto formado por Clostridium, Moorella y Carboxythermus.

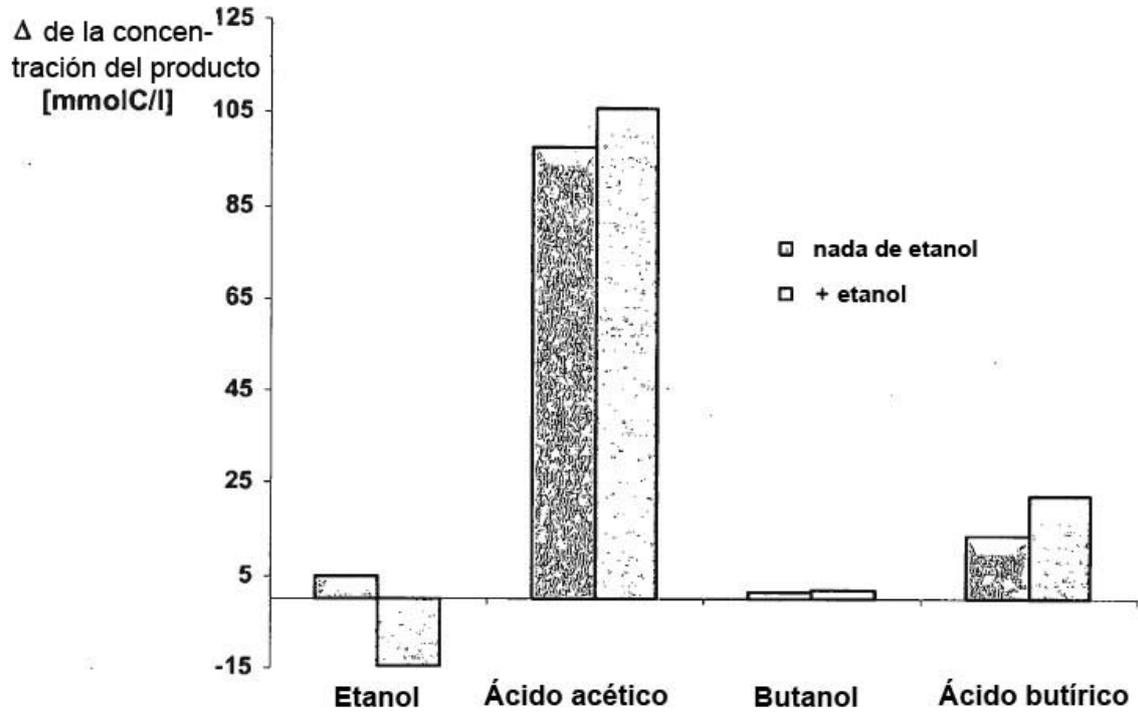


Fig. 1

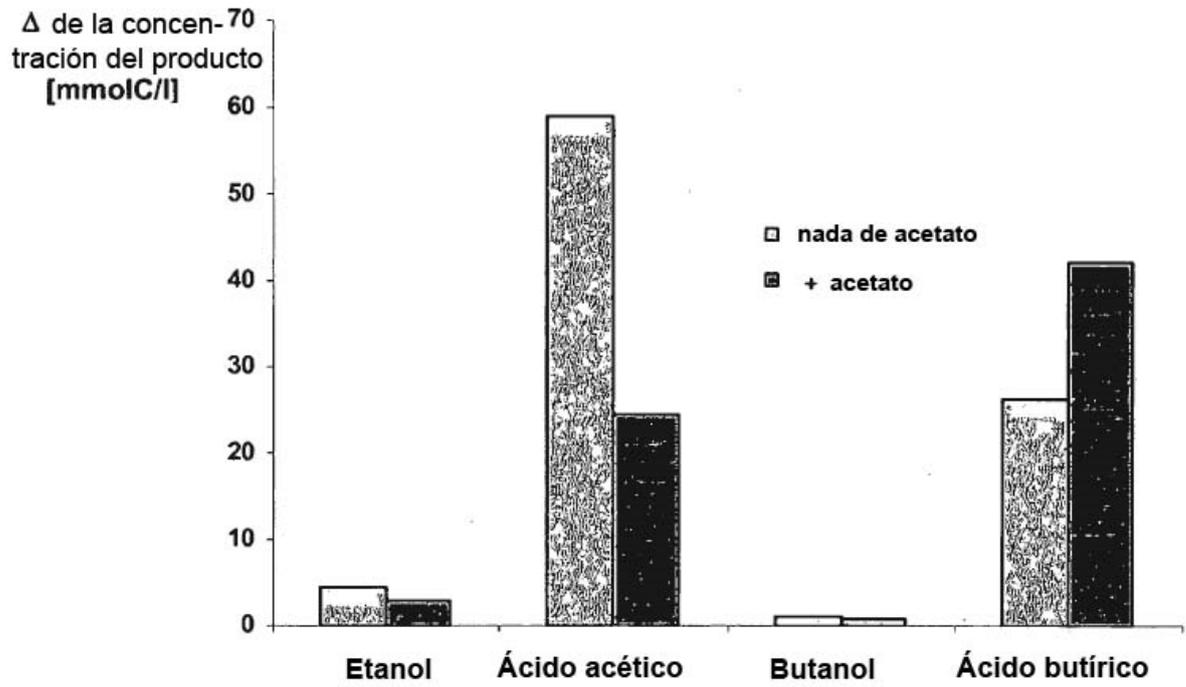


Fig. 2

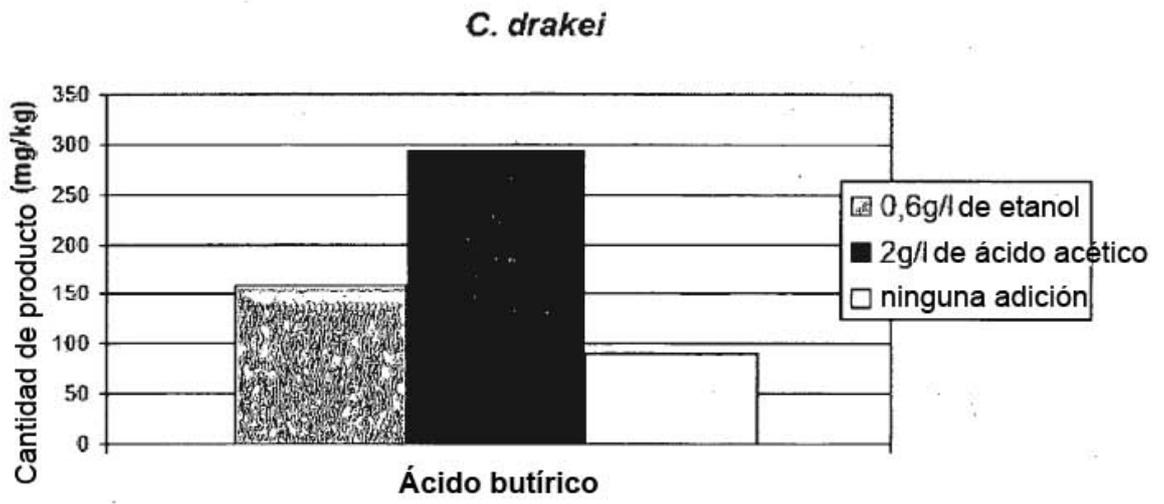


Fig. 3

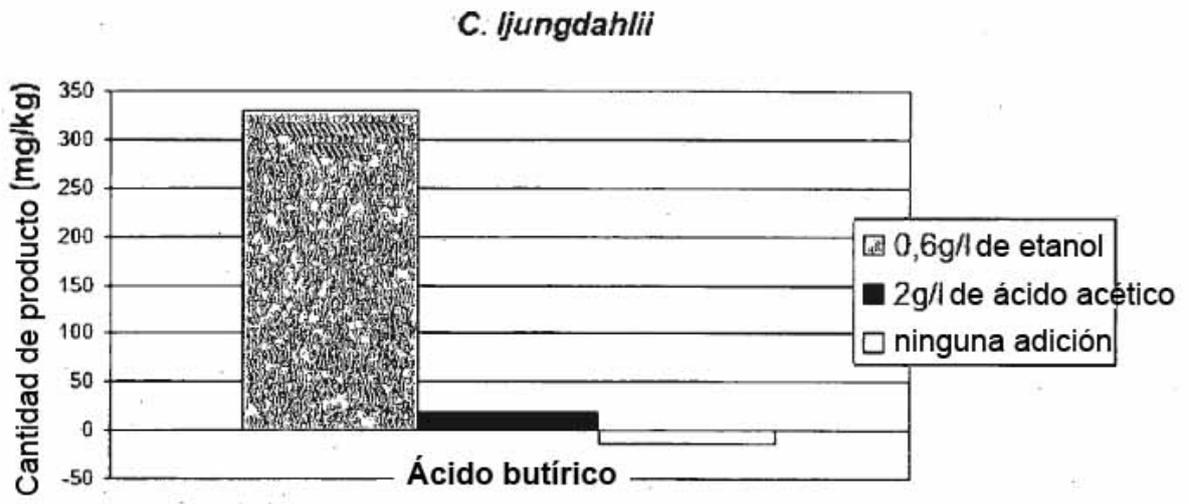


Fig. 4