

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 229**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/04** (2006.01)

**C12P 7/02** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011 E 11733140 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2524046**

54 Título: **Fermentación de CO mediante el uso de un potencial eléctrico**

30 Prioridad:

**14.01.2010 US 295145 P**

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

**21.07.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARKER, WILL, DAVID;  
BROMLEY, JASON, CARL y  
MIHALCEA, CHRISTOPHE, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 578 229 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

Fermentación de CO mediante el uso de un potencial eléctrico

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere en general a métodos para producir productos, en particular alcoholes, mediante la fermentación microbiana de un sustrato que comprende monóxido de carbono (CO), y opcionalmente hidrógeno (H<sub>2</sub>), en el que el método comprende aplicar un potencial eléctrico. En particular, la invención se refiere a métodos para mejorar la eficacia de la captura de carbono en la fermentación carboxidotrónica.

**Antecedentes de la invención**

10 El etanol está convirtiéndose rápidamente en un combustible de transporte líquido rico en hidrógeno importante en todo el mundo. El consumo mundial de etanol en 2005 fue de aproximadamente 12,2 billones de galones (55 billones de litros). 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.

15 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, como un agente oxigenante mezclado en la gasolina, y como un combustible puro por derecho propio. Además, en Europa, las preocupaciones medioambientales sobre las consecuencias de las emisiones de gases de efecto invernadero (GHG) han sido el estímulo para que la Unión Europea (UE) imponga a las naciones miembro un objetivo obligatorio para el consumo de combustibles de transporte sostenibles, tales como el etanol derivado de biomasa.

20

La gran mayoría del etanol combustible se produce por medio de procesos de fermentación tradicionales basados en levaduras que usan carbohidratos derivados de cultivos, tales como sacarosa extraída de caña de azúcar o almidón extraído de cultivos de cereales, como fuente principal de carbono. Sin embargo, el coste de estas materias primas de carbohidratos está influido por su valor como alimento humano o forraje animal, y el uso de cultivos productores de almidón o sacarosa para la producción de etanol no es sostenible económicamente en todas las zonas geográficas. Por lo tanto, es de interés desarrollar tecnologías para convertir fuentes de carbono menos costosas y/o más abundantes en etanol combustible.

25

El CO es un subproducto importante, gratuito, rico en energía, de la combustión incompleta de materiales orgánicos tales como carbón o petróleo y los productos derivados del petróleo. Por ejemplo, se ha informado que la industria del acero de Australia produce y libera anualmente a la atmósfera más de 500.000 toneladas de CO.

30

Se pueden usar procesos catalíticos para convertir gases que consisten principalmente en CO y/o CO e hidrógeno (H<sub>2</sub>) en una diversidad de combustibles y productos químicos. También se pueden usar microorganismos para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procesos biológicos, aunque en general son más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procesos catalíticos, que incluyen una mayor especificidad, mayor rendimiento, costes energéticos inferiores y mayor resistencia al envenenamiento.

35

La capacidad de los microorganismos de crecer con CO como única fuente de carbono se descubrió por primera vez en 1903. Más tarde se determinó que esta era una propiedad de los organismos que usan la ruta bioquímica de acetil coenzima A (acetil CoA) de crecimiento autotrófico (también conocida como la ruta de Woods-Ljungdahl y la ruta de monóxido de carbono deshidrogenasa / acetil CoA sintasa (CODH/ACS)). Se ha demostrado que un gran número de organismos anaerobios, que incluyen organismos carboxidotrónicos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos metabolizan CO hasta diversos productos finales, concretamente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metano, n-butanol, acetato y etanol. Aunque usan CO como única fuente de carbono, dichos organismos producen al menos dos de estos productos finales.

40

Se ha demostrado que las bacterias anaeróbicas, tales como las del género *Clostridium*, producen etanol a partir de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> por medio de la ruta bioquímica de acetil CoA. Por ejemplo, varias cepas de *Clostridium ljungdahlii* que producen etanol a partir de gases se describen en los documentos WO 00/68407, EP 117309, Patentes de EE.UU. n.ºs. 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 a partir de gases (Abrini et al., Archives of Microbiology 161, págs. 345-351 (1994)).

45

50

Sin embargo, la producción de etanol mediante microorganismos por fermentación de gases está asociada siempre a la 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.

55

Varias enzimas que se sabe que están asociadas a la capacidad de los microorganismos de usar monóxido de carbono como única fuente de carbono y energía se sabe que requieren cofactores metálicos para su actividad. Los ejemplos de enzimas clave que requieren la unión de cofactores metálicos para su actividad incluyen la monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH), y acetil-CoA sintasa (ACS).

- 5 Los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/058028, WO2009/064200, WO2009/064201 y WO2009/113878 describen procesos que producen alcoholes, en particular etanol, mediante la fermentación anaerobia de gases que contienen monóxido de carbono. El acetato producido como subproducto del proceso de fermentación descrito en el documento WO2007/117157 se convierte en gas hidrógeno y gas dióxido de carbono, y uno o ambos se pueden usar en el proceso de fermentación anaerobia. El documento WO2009/022925 describe el efecto del pH y ORP en la conversión de sustratos que comprenden CO hasta productos tales como ácidos y alcoholes mediante fermentación. El documento WO2009/058028 describe el uso de gases residuales industriales para la producción de productos, tales como alcohol, mediante fermentación. El documento WO2009/064201 describe portadores para CO y el uso de CO en la fermentación. El documento WO2009/113878 describe la conversión de ácido(s) en alcohol(es) durante la fermentación de un sustrato que comprende CO.
- 10
- 15 La fermentación de sustratos que comprenden CO y/o CO<sub>2</sub> requiere energía (denominada en general 'equivalentes reductores') para fijar el carbono en la masa de células microbianas y/o los productos tales como etanol. Los equivalentes reductores necesarios para la fijación de carbono en la masa de células y los productos se obtienen en general por medio de la oxidación de CO y/o H<sub>2</sub>. En ausencia de H<sub>2</sub>, todos los equivalentes reductores se obtienen de la oxidación de CO a CO<sub>2</sub>. Cuando hay disponible hidrógeno, se puede usar al menos una porción del H<sub>2</sub> para producir los equivalentes reductores, y es necesario oxidar menos CO hasta CO<sub>2</sub>. En casos extremos, en los que hay disponible H<sub>2</sub> en abundancia, todo el carbono del CO y/o CO<sub>2</sub> se puede fijar en la masa de células y los productos, tales como alcoholes, y los equivalentes reductores se pueden obtener todos del H<sub>2</sub>. Cuando se produce CO<sub>2</sub>, representa una ineficacia en la captura de carbono, ya que se expelle del sistema de fermentación, en vez de fijarlo. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso que supere al menos hasta cierto punto las desventajas anteriores, o al menos que proporcione al público una elección útil.
- 20
- 25

#### **Compendio de la invención**

La invención proporciona un método para la fermentación microbiana de un sustrato que comprende monóxido de carbono (CO), y opcionalmente hidrógeno (H<sub>2</sub>), y dicha fermentación se da en un biorreactor, en el que el método comprende aplicar un potencial eléctrico a través de un caldo de fermentación dentro del biorreactor.

- 30 La invención también proporciona un método para fermentar un sustrato que comprende CO, y opcionalmente H<sub>2</sub>, en el que al menos una porción del CO y/o H<sub>2</sub> se usa para producir uno o más equivalentes reductores, en el que el método incluye proporcionar uno o más electrones a la fermentación de forma que la cantidad de CO y/o H<sub>2</sub> usada para producir uno o más equivalentes reductores disminuya respecto de la misma fermentación llevada a cabo sin aplicar dicho potencial eléctrico.
- 35 También se describe un método para mejorar la eficacia de la captura de carbono en la fermentación carboxidotrófica por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl, y el método incluye aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación. En un ejemplo particular, el carbono se captura por medio de la fijación de CO en la masa de células y/o los productos.

En las realizaciones particulares, los productos producidos mediante la fermentación son ácidos y/o alcoholes.

- 40 También se describe un método para incrementar el crecimiento microbiano de un microorganismo en la fermentación de un sustrato que comprende CO, y el método incluye aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación.

- En las realizaciones particulares, las velocidades de crecimiento microbiano se incrementan en al menos un 5%. En las realizaciones particulares, las velocidades de crecimiento microbiano se incrementan en al menos un 10%. En las realizaciones particulares, las velocidades de crecimiento microbiano se incrementan en al menos un 15%. En las realizaciones particulares, las velocidades de crecimiento microbiano se incrementan en al menos un 20%.
- 45

- En las realizaciones particulares, se aplica un potencial a través de la fermentación mediante electrolisis. En las realizaciones particulares, la electrolisis incluye hacer pasar una corriente directa con una tensión de hasta 20 V a través de dos electrodos. En las realizaciones particulares, se aplica un potencial de al menos 2 V, o al menos 4 V, o al menos 6 V, o al menos 8 V, o al menos 10 V, o al menos 15 V, o al menos 20 V. En las realizaciones particulares de la invención, el potencial se puede controlar de forma que se mantenga una corriente sustancialmente constante a través del electrolito a aproximadamente 1 mA, o aproximadamente 2 mA, o aproximadamente 3 mA, o aproximadamente 4 mA, o aproximadamente 5 mA, o aproximadamente 6 mA, o aproximadamente 7 mA, o aproximadamente 8 mA, o aproximadamente 9 mA, o aproximadamente 10 mA.
- 50

- 55 En las realizaciones particulares, el método incluye añadir uno o más mediador(es) de transporte de electrón(es) al caldo de fermentación. De manera alternativa, la fermentación se puede llevar a cabo sin uno o más mediadores de transporte de electrones.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de fermentación de un sustrato que comprende CO, y opcionalmente H<sub>2</sub>, en el que se usa al menos una porción del CO y/o H<sub>2</sub> para producir uno o más equivalentes reductores. El método según este aspecto de la invención incluye proporcionar uno o más electrones a la fermentación, de forma que se puede disminuir o mitigar la cantidad de CO y/o H<sub>2</sub> usada para producir dicho o dichos equivalentes reductores.

Las realizaciones de la invención tienen aplicación particular en la producción de ácidos y alcoholes, en particular etanol, mediante la fermentación 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 amoniaco, 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.

En las realizaciones particulares, el sustrato que contiene CO contendrá en general una proporción importante de CO, tal como al menos alrededor del 20% a alrededor del 100% de CO en volumen, del 40% al 95% de CO en volumen, del 40% al 60% de CO en volumen, y del 45% al 55% de CO en volumen. En las realizaciones particulares, el sustrato comprende alrededor del 25%, o alrededor del 30%, o alrededor del 35%, o alrededor del 40%, o alrededor del 45%, o alrededor del 50% de CO, o alrededor del 55% de CO, o alrededor del 60% de CO en volumen. Los sustratos que tienen concentraciones menores de CO, tal como un 6%, también pueden ser apropiados, en particular cuando también hay presentes H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

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*.

También se describe un biorreactor electroquímico, que comprende medios para introducir un sustrato que comprende CO, y opcionalmente H<sub>2</sub>, en un caldo de fermentación y medios para aplicar un potencial a través del caldo de fermentación. En los ejemplos particulares, el medio para aplicar un potencial es controlable, de forma que se puede mantener una corriente deseada a través del caldo de fermentación.

En los ejemplos particulares, el biorreactor electroquímico se configura de forma que el caldo de fermentación se puede mantener en una semicelda. En los ejemplos particulares, la semicelda excluye oxígeno.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un resumen esquemático de la conversión de CO en materia celular y productos por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl;

La Figura 2 es una vista en planta de un biorreactor que tiene un medio para aplicar un potencial eléctrico de acuerdo con una realización de la presente invención.

#### Descripción detallada de la invención

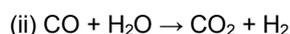
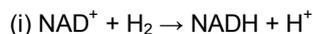
De acuerdo con la descripción, se proporciona un método para mejorar la eficacia de la captura de carbono en la fermentación por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl, y el método incluye aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación. En los ejemplos particulares de la descripción, el carbono se captura por medio de la fijación de CO y/o CO<sub>2</sub> en la masa de células y/o los productos. En las realizaciones particulares, se usan microorganismos carboxidotróficos en la fermentación. En las realizaciones particulares, los productos producidos mediante la fermentación son ácidos y/o alcoholes. Por ejemplo, la fermentación de un sustrato que contiene carbono mediante *Clostridium autoethanogenum* produce productos que incluyen acetato y etanol.

En general, los sustratos que comprenden CO se convierten en materia celular y productos por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl como se representa simplíficadamente en la Figura 1.

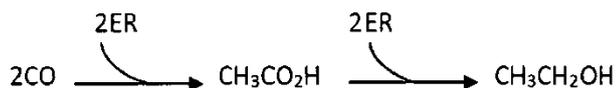
Para el propósito de la presente invención, los equivalentes reductores se pueden definir como la energía reductora biológica, tal como NADH o similar. Los equivalentes reductores se usan en los procesos celulares, tales como la fermentación, para fijar el carbono en el/los producto(s) y la masa de células, y se usan como energía reductora para producir y reducir los metabolitos formados en la fermentación.

Como entenderá una persona experta en la técnica, la fermentación es un proceso que permite a las células obtener energía a partir de la oxidación de los compuestos orgánicos. En condiciones anaerobias, la fermentación permite que se dé la respiración en ausencia de oxígeno. Existen varios procesos de fermentación anaerobia bien conocidos, que incluyen la fermentación de etanol, la fermentación de ácido láctico y la glicolisis. La fermentación de sustratos que comprenden CO por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl requiere energía para fijar el carbono en la masa de células y/o los productos. Los equivalentes reductores proporcionan la energía necesaria para estas

reacciones. La fermentación de un sustrato que comprende CO puede producir producto(s) que incluye(n), pero sin limitación, alcohol(es) y/o ácido(s). Los ejemplos de los metabolitos formados mediante tal fermentación incluyen, pero sin limitación, ácidos; tales como acetato, propionato, butirato, lactato, acrilato; y otros productos, tales como etanol, acetona, propanol, butanol y 2,3-butanodiol. Los equivalentes reductores se obtienen a partir de H<sub>2</sub> o CO a través de (i) Hidrogenasa o (ii) Reacciones de Desplazamiento de Gas de Agua:



El siguiente ejemplo (no limitante) demuestra la necesidad de equivalentes reductores (ER) en la conversión de CO en etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH).



Como se puede observar en la ecuación anterior, la conversión de CO en etanol requiere dos moléculas de carbono, como las proporcionadas por el 2CO mostrado. Son necesarios dos equivalentes reductores para la fijación del carbono y la reducción del CO hasta CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H. Son necesarios otros dos equivalentes reductores para la reducción de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H hasta CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH. Las necesidades de estos equivalentes reductores se cumplen con la estequiometría siguiente;



En este caso, los equivalentes reductores se están obteniendo a partir de CO por medio de la reacción de desplazamiento de gas de agua. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, al menos una porción de los equivalentes reductores necesarios para fijar CO se proporcionan eléctricamente. Sin desear limitarse por la teoría, se considera que aplicar un potencial a través de una fermentación puede dar como resultado la regeneración de energía reductora o equivalentes reductores, de forma que están disponibles para las reacciones de reducción celular necesarias para fijar carbono. En las realizaciones particulares, se proporcionan electrones a uno o más microorganismos para reducir la cantidad de CO, y opcionalmente H<sub>2</sub>, necesaria para fijar carbono en la masa de células y/o los productos. De manera proporcional a la disminución de la cantidad de CO necesaria para fijar carbono en la masa de células y/o los productos, también disminuye la cantidad de CO<sub>2</sub> producida como subproducto de la reacción. En las realizaciones particulares, los electrones se proporcionan mediante electrolisis.

En las fermentaciones de carbohidratos electroquímicas conocidas, los electrones se hacen accesibles en general mediante el uso de mediadores de transporte de electrones, tales como metil viológeno, bencil viológeno o rojo neutro. Los ejemplos de tales fermentaciones se detallan en Zeikus et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58: 476-481 y las referencias citadas en ese documento. En las realizaciones particulares de la invención, los electrones se proporcionan sin la necesidad de mediadores de transporte de electrones. Sin desear limitarse por la teoría, se considera que uno o más componentes de los medios descritos en la sección de Ejemplos en la presente memoria pueden actuar como transportadores de electrones.

También se ha reconocido sorprendentemente que cuando se aplica un potencial a través de una fermentación, el metabolismo de el/los microorganismo(s) puede cambiar. En las realizaciones particulares de la invención, la aplicación de un potencial da como resultado un incremento del crecimiento microbiano. En las realizaciones particulares, la velocidad de crecimiento microbiano se incrementa al menos un 5%, o al menos un 10%, o al menos un 15%, o al menos un 20%. Como tal, la invención proporciona un método para incrementar la velocidad de crecimiento de un microorganismo. Se observa que puede haber una reducción ligera en la producción de metabolitos como resultado del desplazamiento en el metabolismo de fijación de carbono.

Además, se reconoce que durante la fermentación puede haber etapas en las que el crecimiento microbiano sea una prioridad, tal como durante el inicio. Durante esta etapa, se puede aplicar un potencial a través de la fermentación de forma que se incremente la velocidad de crecimiento. Durante las etapas de fermentación, en las que la formación de producto es la prioridad, se puede reducir o eliminar el potencial.

También se describe un biorreactor electroquímico, que comprende medios para proporcionar un sustrato que comprende CO a uno o más microorganismos y medios para proporcionar electrones a uno o más microorganismos. Los microorganismos carboxidotróficos son normalmente anaerobios, y la fermentación del sustrato que comprende CO se proporciona en general en forma gaseosa. La fermentación de los sustratos que comprenden CO se pueden llevar a cabo en un biorreactor que contiene un caldo de fermentación que comprende uno o más microorganismos y los nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento y el metabolismo de las células. De acuerdo con la invención, se pueden proporcionar electrones a los microorganismos aplicando un potencial eléctrico a través del caldo de fermentación. El caldo de fermentación es en general un medio nutriente acuoso que comprende microorganismos, nutrientes metálicos y no metálicos. Tales medios nutrientes líquidos son electrolitos adecuados, en los que se pueden proporcionar electrones por medio de uno o más electrodos.

En los ejemplos particulares, la fermentación se debe mantener de manera anaerobia, por lo que no se puede usar la electrolisis simple del agua, ya que el oxígeno generado de manera electrolítica puede ser perjudicial para el funcionamiento de las células microbianas. Sin embargo, se pueden proporcionar electrones a un caldo de fermentación por medio de una semicelda, en la que se puede colocar el cátodo en el biorreactor y se puede colocar un ánodo fuera del biorreactor, en la que la generación de oxígeno no es perjudicial para la fermentación. En tales semiceldas, se puede mantener el circuito eléctrico proporcionando un puente salino y/o membrana permeable para mantener el flujo de iones.

También se reconoce que los métodos de la invención también pueden incrementar la eficacia energética global de la fermentación del sustrato que comprende CO y opcionalmente H<sub>2</sub>. Estos sustratos se proporcionan en general en forma gaseosa, y existe un coste de energía significativo asociado a la transferencia de tales compuestos a una disolución para la conversión en productos. Sin embargo, la energía necesaria para transferir la misma cantidad de equivalentes reductores, en forma de electrones, a una disolución es sustancialmente menor.

#### Definiciones

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

Se debería entender que la expresión "sustrato que comprende monóxido de carbono" y las expresiones similares incluyen cualquier sustrato en el que haya disponible monóxido de carbono para una o más cepas de bacterias para el crecimiento y/o la fermentación, por ejemplo.

"Sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" incluye cualquier gas que contenga monóxido de carbono. El sustrato gaseoso contendrá típicamente una proporción significativa de CO, al menos alrededor del 5% a alrededor del 100% de CO en volumen.

En el contexto de los productos de fermentación, la expresión "ácido", tal como se usa en la presente memoria, incluye los ácidos carboxílicos y el anión carboxilato asociado, tal como la mezcla de ácido acético libre y acetato presente en un caldo de fermentación como se describe en la presente memoria. La relación de ácido molecular a carboxilato en el caldo de fermentación es dependiente del pH del sistema. El término "acetato" incluye tanto la sal de acetato sola como una mezcla de ácido acético molecular o libre y sal de acetato, tal como la mezcla de sal de acetato y ácido acético libre presente en un caldo de fermentación como se puede describir en la presente memoria. La proporción de ácido acético molecular respecto de acetato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema.

"Mediadores de transporte de electrones" o "Mediador(es) redox" y similares, como se usan en la presente memoria, pretenden referirse a un transportador de electrones que actúa como un donante de electrones y/o aceptor de electrones reversible. Los mediadores incluyen tintes de viológeno (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 los grupos secundarios VI, VII y VIII.

El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o montajes de torres o tuberías, que incluye el reactor de tanque con agitación continua (CSTR), reactor de célula inmovilizada (ICR), reactor de lecho irrigado (TBR), reactor de biopelícula en lecho móvil (MBBR), columna de burbujas, fermentador con inyección de gas, 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.

A menos que el contexto lo requiera de otra manera, las frases "fermentar", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, tal como se usan en la presente memoria, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de los productos del proceso. 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, se debería entender que la adición de metales o composiciones a una reacción de fermentación incluye la adición a uno o ambos reactores.

Aunque la siguiente descripción se centra en realizaciones particulares de la invención, concretamente la producción de etanol y/o acetato mediante el uso de CO como sustrato principal, se debería apreciar que la invención puede ser aplicable a la producción de alcoholes y/o ácidos alternativos y al uso de sustratos alternativos como conocerán las personas de experiencia habitual en la técnica a la que se refiere la invención. Por ejemplo, se pueden usar sustratos gaseosos que contienen dióxido de carbono e hidrógeno. Además, la invención puede ser aplicable a la fermentación para producir butirato, propionato, caproato, etanol, propanol, y butanol. Los métodos también pueden ser útiles en la producción de hidrógeno. A modo de ejemplo, estos productos se pueden producir mediante fermentación con el uso de microbios del género *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacrer*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina*, y *Desulfotomaculum*.

### Fermentación

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, se usan preferiblemente bacterias acetogénicas para producir ácidos y/o alcoholes, en particular 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 una aplicabilidad particular para mejorar la captura de carbono total y/o la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos que comprenden CO. Los procesos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos se conocen. Los procesos ejemplares incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/064200, US 6.340.581, US 6.136.577, US 5.593.886, US 5.807.722 y US 5.821.111.

Se sabe que varias bacterias anaeróbicas son capaces de llevar a cabo la fermentación de CO a alcoholes, que incluyen *n*-butanol y etanol, y ácido acético, y son adecuadas para el uso en el proceso de la presente invención. Los ejemplos de tales bacterias que son adecuadas para el uso en la invención incluyen las del género *Clostridium*, tales como las cepas de *Clostridium ljungdahlii*, que incluyen las descritas en los documentos WO 00/68407, EP 117309, las patentes de EE.UU. N°s 5.173.429, 5.593.886, y 6.368.819, los documentos 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 las del género *Moorella*, que incluyen *Moorella sp* HUC22-1, (Sakai et al, Biotechnology Letters 29: págs. 1607-1612), y las del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G. et al (1991), Systematic and Applied Microbiology 14: 254-260). Los 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, se debería entender que otras bacterias anaeróbicas acetogénicas pueden ser aplicables a la presente invención como entendería un experto en la técnica. Se apreciara también que la invención puede aplicarse a un cultivo mixto de dos o más bacterias.

Un microorganismo ejemplar 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 con inyección de gas, 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.

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 subproducto de un proceso industrial, o de 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 amoníaco, 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 H<sub>2</sub>, con volúmenes mínimos de CO<sub>2</sub>, metano, etileno y etano. Por ejemplo, los subproductos de biomasa obtenidos durante la extracción y procesamiento 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 en general una proporción importante de CO, tal como al menos alrededor del 20% a alrededor del 100% de CO en volumen, del 40% al 95% de CO en volumen, del 60% al 90% de CO en volumen, y del 70% al 90% de CO en volumen. En las realizaciones particulares, el sustrato comprende un 25%, o 30%, o 35%, o 40%, o 45%, o 50% de CO en volumen. Los sustratos que tienen concentraciones inferiores de CO, tales como un 6%, también pueden ser adecuados, en particular cuando también están presentes H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

Mientras que no es necesario para el sustrato contener ningún hidrógeno, la presencia de H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>:CO. En otras realizaciones, la corriente de sustrato comprende bajas concentraciones de H<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub> por ejemplo, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO<sub>2</sub> en volumen, o 1% a aproximadamente 30% de CO<sub>2</sub> en volumen.

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 microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volumen 101, Número 3 / Octubre, 2002) podría usarse para este propósito.

Se apreciará que para que se dé el crecimiento de las bacterias y la fermentación de CO a alcohol, 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, los medios adecuados se describen en las patentes de EE.UU. N°s 5.173.429 y 5.593.886 y en los documentos WO 02/08438, WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/058028, WO2009/064200, WO2009/064201 y WO2009/113878, mencionados anteriormente. La presente descripción proporciona un medio que tiene una eficacia incrementada en el mantenimiento del crecimiento de los microorganismos y/o en la 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 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. Se describen condiciones adecuadas en los documentos WO02/08438, WO07/117157, WO08/115080 y WO2009/022925.

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, debido a que una velocidad de conversión de CO a etanol determinada 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 puede 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.

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 pueden ser que el producto de etanol se consume por el cultivo.

#### *Recuperación de producto*

Los productos de la reacción de fermentación pueden recuperarse usando métodos conocidos. Los métodos ejemplares 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.

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.

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.

El acetato, que se produce como subproducto en la reacción de fermentación, también puede recuperarse del caldo de fermentación mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

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 hace pasar después 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.

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.

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 codisolvente que puede usarse para la extracción de ácido acético a partir de caldos de fermentación. Como con el ejemplo del sistema basado en alcohol oleico descrito para la fermentación extractiva de etanol, los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. N°s 6.368.819 y 6.753.170 describen un disolvente/co-disolvente inmiscible con agua que se puede mezclar 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.

#### *Fermentación electroquímica*

También se describe un método para mejorar la eficacia de la captura de carbono en la fermentación carboxidotrófica por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl, y el método incluye aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación. Se puede aplicar un potencial eléctrico a través de una fermentación mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un medio conocido para aplicar un potencial eléctrico es una celda electroquímica. En particular, una celda electroquímica adecuada para el uso con los métodos de la invención es una celda electrolítica. De acuerdo con la invención, la fermentación se lleva a cabo en general con un caldo de fermentación que comprende uno o más microorganismos y un medio nutriente acuoso que comprende nutrientes esenciales que incluyen iones metálicos. Como tal, el medio nutriente líquido proporciona un electrolito ideal para la electrolisis. Por lo tanto, se puede aplicar un potencial proporcionando electrodos conectados a un circuito eléctrico.

En las realizaciones particulares de la invención, el microorganismo es anaerobio y se debe mantener sustancialmente sin oxígeno. En la electrolisis, en la que ambos electrodos se introducen en un electrolito, se formará oxígeno en el ánodo por medio de la disociación del agua. Esto sería perjudicial para el cultivo microbiano. Como tal, en las realizaciones particulares, el método incluye aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación por medio de una semicelda, en la que el ánodo está separado del caldo de fermentación por medio de una membrana permeable a iones o puente salino alternativo. En tales realizaciones, se puede descargar el oxígeno sin perjuicio para el cultivo microbiano.

De acuerdo con la invención, el potencial eléctrico aplicado a la fermentación incrementa la eficacia de la fijación de carbono. En las realizaciones particulares de la invención, una bacteria carboxidotrófica fijará al menos una porción de un sustrato que comprende CO en la masa de células y/o los productos, tales como etanol. La energía necesaria para fijar el carbono se denomina en general 'equivalentes reductores', y se pueden obtener por medio de la oxidación de varias entidades reducidas. Las bacterias carboxidotróficas, tales como *Clostridium autoethanogenum*, obtienen en general los equivalentes reductores por medio de la oxidación de CO, y opcionalmente de H<sub>2</sub>. Sin embargo, de acuerdo con la invención, se mejora la eficacia de la fijación de carbono por medio de la aplicación de un potencial a través de una fermentación. De acuerdo con la invención, el carbono se fija en forma de masa de células y productos, tales como etanol, con una necesidad inferior de CO, y opcionalmente de H<sub>2</sub>, como equivalentes reductores. Así, la aplicación de un potencial a través de una fermentación carboxidotrófica disminuye la cantidad de CO<sub>2</sub> producida por cantidad de carbono fijada en forma de masa de células y/o productos.

En general, cuando se aplica un potencial a través de una fermentación, se reducen uno o más mediadores de transporte de electrones, tales como bencil viológeno o metil viológeno presentes en el caldo de fermentación. Estos mediadores, a su vez, ayudan en la reducción de la maquinaria de reducción de las células microbianas, tal como el par Ferredoxina<sub>ox/red</sub> o los pares NAD(P)H/NAD(P). Así, de acuerdo con las realizaciones particulares de la invención, se proporcionan uno o más mediadores de transporte de electrones en el caldo de fermentación. Sin embargo, en las realizaciones particulares, el método se desarrolla sin la necesidad de mediadores de transporte de electrones.

También se ha reconocido que la aplicación de un potencial también puede alterar cómo el/los microorganismo(s) fija(n) el carbono. En el ejemplo proporcionado en la presente memoria, la aplicación de un potencial a través de una fermentación incrementa la proporción de carbono dirigida hacia la masa de células, y como tal incrementa el crecimiento microbiano. En las realizaciones particulares, el crecimiento microbiano se incrementa al menos un 5%, o al menos un 10%, o al menos un 15%, o al menos un 20%.

Los expertos en la técnica apreciarán cómo determinar el potencial necesario para mejorar la eficacia de la fijación de carbono y/o para mejorar el crecimiento microbiano. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede aplicar una corriente directa con una tensión de hasta 20 V a través de los electrodos. En las realizaciones particulares, se aplica un potencial de al menos 2 V, o al menos 4 V, o al menos 6 V, o al menos 8 V, o al menos 10 V, o al menos 15 V, o al menos 20 V. En las realizaciones particulares de la invención, el potencial se puede controlar de forma que se mantenga una corriente sustancialmente constante a través del electrolito a aproximadamente 1 mA, o aproximadamente 2 mA, o aproximadamente 3 mA, o aproximadamente 4 mA, o aproximadamente 5 mA, o aproximadamente 6 mA, o aproximadamente 7 mA, o aproximadamente 8 mA, o aproximadamente 9 mA, o

aproximadamente 10 mA. De nuevo, los expertos en la técnica apreciarán cómo determinar una corriente óptima, que puede cambiar a lo largo del tiempo y puede ser diferente para microorganismos diferentes.

5 También se describe un biorreactor electroquímico, que comprende medios para introducir un sustrato que comprende CO, y opcionalmente H<sub>2</sub>, en un caldo de fermentación y medios para aplicar un potencial a través del caldo de fermentación. En las realizaciones particulares, el medio para aplicar un potencial es controlable, de forma que se puede mantener una corriente deseada a través del caldo de fermentación.

10 La Figura 2 muestra un biorreactor electroquímico según un ejemplo particular de la descripción. El biorreactor 1 incluye medios para suministrar un sustrato gaseoso (2) y medios para aplicar un potencial a través de una fermentación. En los ejemplos particulares de la descripción, la fermentación es anaerobia, por lo tanto el biorreactor electroquímico comprende dos electrodos 3 separados por un separador 4 permeable a iones. El separador permeable a iones puede ser una membrana porosa o material cerámico u otro material adecuado conocido en la técnica. En el uso, una porción del biorreactor 5 se puede rellenar con un caldo de fermentación que comprende uno o más microorganismos y un medio nutriente líquido. En el uso, otra porción del biorreactor 6 se puede rellenar con una disolución salina conductora. Los electrodos 3 se configuran de forma que, en el uso, se pueden introducir en el caldo de fermentación y la disolución salina conductora. El biorreactor también comprende un circuito eléctrico y medios para controlar un potencial (7) a través de los electrodos.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Disolución A			
NH <sub>4</sub> Ac	3,083 g	KCl	0,15 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,61 g		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,294 g	Agua Destilada	Hasta 1 L
Disolución(es) B			
Componente	mol/L de H <sub>2</sub> O	Componente	mol/L de H <sub>2</sub> O
FeCl <sub>3</sub>	0,1	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .	0,01
CoCl <sub>2</sub>	0,05	ZnCl <sub>2</sub>	0,01
NiCl <sub>2</sub>	0,05	MnCl <sub>2</sub>	0,01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01	NTA	0,3
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,01		
Disolución C			
Biotina	20,0 mg	D-(*)-pantotenato de calcio	50,0 mg
Ácido fólico	20,0 mg		
Piridoxina. HCl	10,0 mg	Vitamina B12	50,0 mg
Tiamina. HCl	50,0 mg	Ácido p-aminobenzoico	50,0 mg
Riboflavina	50,0 mg	Ácido tióctico	50,0 mg
Ácido nicotínico	50,0 mg	Agua destilada	A 1 litro

20

## Preparación de disolución de Cr (II)

Un matraz de tres bocas de 1 L se equipó con una entrada y salida herméticas de gases para permitir el funcionamiento bajo un gas inerte y la transferencia posterior del producto deseado a un matraz de almacenamiento adecuado. El matraz se cargó con  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (40 g, 0,15 mol), gránulos de zinc [malla 20] (18,3 g, 0,28 mol), mercurio (13,55 g, 1 mL, 0,0676 mol) y 500 mL de agua destilada.

Tras purgar con  $\text{N}_2$  durante una hora, la mezcla se calentó hasta alrededor de 80 °C para iniciar la reacción. Tras dos horas de agitación bajo un flujo constante de  $\text{N}_2$ , la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó continuamente durante otras 48 horas, en cuyo momento la mezcla de reacción se había transformado en una disolución de color azul intenso. La disolución se transfirió a botellas de suero purgadas con  $\text{N}_2$ , y se almacenó en un frigorífico para el uso futuro.

Bacterias: El *Clostridium autoethanogenum* usado es el depositado en el Centro de Recursos Alemán para Material Biológico (DSMZ) y asignado al número de acceso DSMZ 19630.

*Toma de muestras y procedimientos analíticos*

Se tomaron muestras del medio del reactor CSTR a intervalos a lo largo de periodos de hasta 20 días. Cada vez que se tomaron muestras del medio, se tuvo cuidado de asegurar que no se dejase entrar o escapar gas del reactor.

*HPLC:*

Sistema HPLC Agilent 1100 Series. Fase móvil: Ácido sulfúrico 0,0025 N. Flujo y presión: 0,800 mL/min. Columna: Alltech IOA; N° de catálogo 9648; 150 x 6,5 mm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Temperatura de columna: 60°C. Detector: Índice refractivo. Temperatura del detector: 45°C.

*Método para la preparación de la muestra:*

400  $\mu\text{L}$  de muestra y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{ZnSO}_4$  0,15M y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,15M se cargan en un tubo Eppendorf. Los tubos se centrifugan durante 10 min. a 12.000 rpm, 4°C. 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se transfieren en un vial de HPLC, y 5  $\mu\text{L}$  se inyectan en el instrumento HPLC.

*Análisis del espacio de aire:*

Se llevaron a cabo medidas en un Varian CP-4900 micro GC con dos canales instalados. El canal 1 fue una columna de tamiz molecular 10m que funcionaba a 70 °C, 200 kPa de argón y un tiempo de retroflujo de 4,2 s, mientras el canal 2 fue una columna 10m PPQ que funcionaba a 90 °C, 150 kPa de helio y sin retroflujo. La temperatura del inyector para ambos canales fue 70 °C. Los tiempos de funcionamiento se ajustaron a 120 s, pero todos los picos de interés eluirían normalmente antes de 100 s.

## Ejemplo 1: Fermentación de lotes en CSTR

Dos CSTRs de 2 L (A) y (B) se ajustaron en las condiciones siguientes: El medio se preparó como sigue: Se añadió un 85% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (30 mM) a 1,5 L de disolución A. El pH del medio se ajustó a 5,3 mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La disolución de medio se esterilizó mediante autoclave durante 30 minutos a 121 °C, o mediante esterilización con filtro antes del uso. Se añadió resazurina como indicador redox. La disolución de medio se transfirió de manera aséptica y anaerobia a un recipiente CSTR de 1,5 L, y se hizo burbujear continuamente  $\text{N}_2$ . Una vez transferido al recipiente de fermentación, se pudo medir el estado de reducción y el pH del medio transferido directamente por medio de sondas. El medio se calentó a 37 °C y se agitó a 300 rpm.

Se añadió una disolución de sulfuro sódico (3,75 mL de una disolución 0,2 M), seguido de una disolución B de oligoelementos metálicos (1.5 mL),  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (1.5 mL de una disolución 0,01 M), y después Disolución C (15 mL). El ORP de la disolución se ajustó a aprox. -200 mV mediante el uso de una disolución de Cr(II).

El fermentador B se convirtió en un biorreactor electroquímico modificando el CSTR con dos electrodos de acero inoxidable. El cátodo se introdujo en el medio nutriente líquido mientras el ánodo se introdujo en un recipiente de semicelda separado del medio nutriente líquido por una membrana permeable a iones. El recipiente de la semicelda del ánodo contuvo una disolución de KCl 3 M. Se aplicó una corriente directa a través de los electrodos con un potencial de 10-15 V, de forma que la corriente se mantuvo a aproximadamente 7 mA a lo largo de la fermentación.

Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla del 2% de  $\text{H}_2$ , 33% de  $\text{N}_2$ , 44% de  $\text{CO}$ , 21% de  $\text{CO}_2$  y 100% de  $\text{H}_2$ . Se inoculó un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* que crecía activamente en el CSTR a un nivel de aproximadamente un 10% (v/v). Durante este experimento, se añadió una disolución de  $\text{Na}_2\text{S}$  a una velocidad de aprox. 0,16 mMol/día. Los fermentadores se hicieron funcionar en condiciones sustancialmente similares, y el suministro de sustratos se incrementó en respuesta a las necesidades de cada cultivo microbiano para comparar el fermentador de control (A) con el biorreactor electroquímico (B).

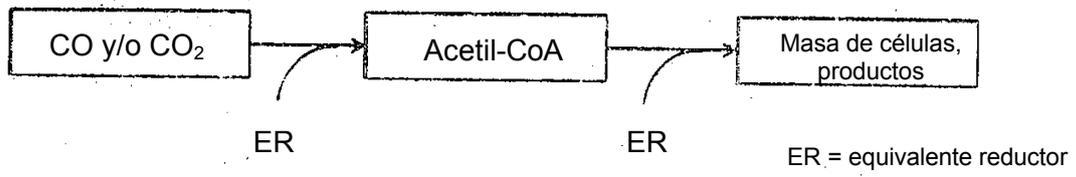
ES 2 578 229 T3

Fermentador	Día	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	Absorción de CO total (mmol/L)	Producción de CO <sub>2</sub> total (mmol/L)	Proporción CO <sub>2</sub> producido /CO <sub>2</sub> consumido
A	0,6	0,60*	1,0*	382	252	0,66
	0,8	0,78*	1,9*	604	398	0,66
	1,0	1,02	3,8	850	563	0,66
	1,2	1,28*	5,7*	1121	749	0,67
	1,4	1,59*	7,6*	1427	962	0,67
	0,73	1,90*	9,5*	1783	1209	0,68
	1,8	2,12	12,1	2205	1500	0,68
	2,0	2,40	14,9	2711	1848	0,68
B	0,6	0,70*	1,0*	591	272	0,46
	0,8	0,82*	1,8*	753	366	0,49
	1,0	1,16	3,3	940	483	0,51
	1,2	1,51*	5,0*	1173	638	0,54
	1,4	1,80*	6,9*	1470	837	0,57
	0,73	2,18*	8,7*	1844	1090	0,59
	1,8	2,61	10,9	2308	1403	0,61
	2,0	3,00	13,7	2869	1778	0,62
*Extrapolado de una representación gráfica de los parámetros de fermentación						

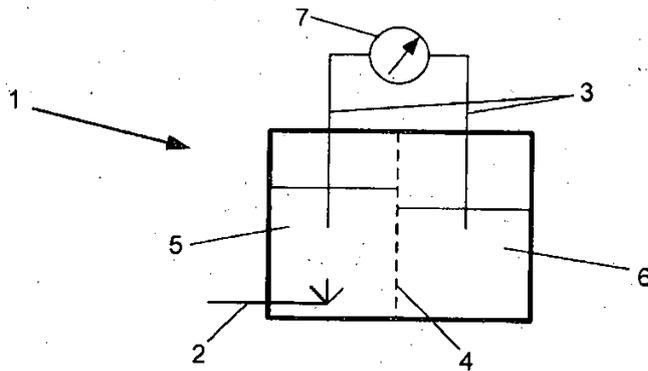
5 El CO<sub>2</sub> producido en el biorreactor electroquímico (B) fue sustancialmente menor que el producido en (A) a lo largo de la fermentación. Esto indica que se usó menos CO para la producción de equivalentes reductores en (B) que en (A). Esto es inesperado, ya que el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos son similares. Se considera que los electrones disponibles en el biorreactor electroquímico (B) compensan la cantidad de equivalentes reductores necesarios para fijar una cierta cantidad de carbono en forma de masa de células microbianas y/o productos. Otro resultado sorprendente es que el crecimiento microbiano en el biorreactor electroquímico (B) supera al del fermentador (A) en aproximadamente un 20%, mientras la producción de etanol se redujo ligeramente.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la fermentación microbiana de un sustrato que comprende monóxido de carbono (CO), y dicha fermentación se da en un biorreactor, en el que el método comprende aplicar un potencial eléctrico a través de un caldo de fermentación dentro del biorreactor.
- 5 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el sustrato comprende además H<sub>2</sub>.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO produce uno o más producto(s), y dicho(s) producto(s) incluye(n) alcohol(es) y/o ácido(s).
4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la aplicación de dicho potencial eléctrico da como resultado que se dé la electrolisis en el caldo de fermentación.
- 10 5. El método de la reivindicación 4, en el que se aplica tensión a través de dos electrodos para generar una corriente directa entre ellos, y dichos electrodos están sumergidos en un electrolito.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la tensión tiene un potencial de al menos 2 V.
7. El método de la reivindicación 5, en el que se controla la tensión para permitir una corriente sustancialmente constante a través del electrolito.
- 15 8. El método de la reivindicación 7, en el que la corriente sustancialmente constante a través del electrolito se mantiene por encima de aproximadamente 1 mA.
9. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que se proporcionan uno o más mediadores de transporte de electrones en el caldo de fermentación contenido en el biorreactor.
- 20 10. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que se mejora la captura de carbono respecto de la misma fermentación llevada a cabo sin aplicar dicho potencial eléctrico.
11. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que se incrementa el crecimiento microbiano de un microorganismo respecto de la misma fermentación llevada a cabo sin aplicar dicho potencial eléctrico.
- 25 12. Un método para fermentar un sustrato que comprende CO, en el que al menos una porción del CO se usa para producir uno o más equivalentes reductores, en el que el método incluye proporcionar uno o más electrones a la fermentación de forma que la cantidad de CO usada para producir uno o más equivalentes reductores disminuye respecto de la misma fermentación llevada a cabo sin aplicar dicho potencial eléctrico.
- 30 13. Un método según la reivindicación 12, en el que el sustrato comprende además H<sub>2</sub>, y al menos una porción del CO y/o H<sub>2</sub> se usa para producir uno o más equivalentes reductores, en el que el método incluye proporcionar uno o más electrones a la fermentación de forma que la cantidad de CO y/o H<sub>2</sub> usada para producir uno o más equivalentes reductores disminuye respecto de la misma fermentación llevada a cabo sin aplicar dicho potencial eléctrico.
14. El método de la reivindicación 12 ó 13, en el que se usan uno o más equivalentes reductores para fijar el carbono en la masa de células y/o uno o más producto(s).
- 35 15. El método de la reivindicación 14, en el que el o los producto(s) son ácido(s) y alcohol(es).



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**