

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 604**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

C12Q 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2010 PCT/NZ2010/000009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO2010093262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2010 E 10741458 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2391724**

54 Título: **Método para mejorar la eficacia de la fermentación microbiana**

30 Prioridad:

29.01.2009 US 148282 P
10.11.2009 US 259887 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SIMPSON, SEAN, DENNIS y
TIZARD, JOSEPH, HENRY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 616 604 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 para mejorar la eficacia de la fermentación microbiana

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a métodos para incrementar la eficiencia del crecimiento microbiano y la producción por fermentación microbiana de sustratos gaseosos. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para producir alcoholes, particularmente etanol, por fermentación microbiana de sustratos gaseosos que contienen monóxido de carbono. En realizaciones particulares, la invención se refiere a métodos de determinación de la conversión neta global de CO en productos durante la fermentación microbiana.

Antecedentes de la invención

10 El etanol se está convirtiendo rápidamente en un importante combustible para el transporte de líquido rico en hidrógeno en todo el mundo. El consumo mundial de etanol en 2005 fue estimado en 12,2 millones de galones. El mercado mundial de la industria del etanol combustible también se ha predicho que seguirá creciendo fuertemente en el futuro, debido a un mayor interés en el etanol en Europa, Japón, EE.UU. y varios países en desarrollo.

15 Por ejemplo, en los EE.UU., el etanol se utiliza para producir E10, una mezcla 10% de etanol en la gasolina. En las mezclas E10, el componente de etanol actúa como un agente de oxigenación, mejorando la eficiencia de la combustión y reduciendo la producción de contaminantes del aire. En Brasil, el etanol satisface aproximadamente el 30% de la demanda de combustible para el transporte, como agente oxigenante mezclado en la gasolina y como combustible puro en sí mismo. Además, en Europa, las preocupaciones ambientales que rodean las consecuencias de las emisiones de los Gases Efecto Invernadero (GEI) han sido un estímulo para que la Unión Europea (UE) establezca a los países miembros un objetivo obligatorio para el consumo de combustibles para el transporte sostenible, tales como el etanol derivado de biomasa.

20

La gran mayoría del etanol combustible se produce a través de procesos tradicionales de fermentación a base de levadura que utilizan carbohidratos derivados de cultivo, tales como la sacarosa extraída de la caña de azúcar o el almidón extraído de los cultivos de cereales, como la fuente principal de carbono. Sin embargo, el costo de estos materiales de alimentación de hidratos de carbono se ve influenciado por su valor como alimento humano o animal, y el cultivo de cosechas productoras de almidón o sacarosa para la producción de etanol no es económicamente sostenible en todas las geografías. Por lo tanto, tiene interés el desarrollo de tecnologías que conviertan recursos de carbono de costos más bajos y/o más abundantes en etanol combustible.

25

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

30

Se pueden utilizar procesos catalíticos para convertir los gases que consisten principalmente en CO y/o CO e hidrógeno (H₂) en una variedad de combustibles y productos químicos. Los microorganismos también pueden ser usados para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procesos biológicos, aunque generalmente sean más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procesos catalíticos, incluyendo una mayor especificidad, rendimientos más altos, más bajos costos de energía y una mayor resistencia a la intoxicación.

35

La capacidad de los microorganismos para crecer en CO como única fuente de carbono fue descubierta por primera vez en 1903. Fue determinado más tarde que esto era una propiedad de los organismos que utilizan la vía bioquímica de la acetil coenzima A (acetil CoA) de crecimiento autotrófico (también conocida como la ruta de Woods-Ljungdahl y la vía de la monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil CoA sintasa (CODH/ACS)). Un gran número de organismos anaerobios incluyendo organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos han demostrado que metabolizan el CO en diversos productos finales, a saber, CO₂, H₂, metano, n-butanol, acetato y etanol. Durante el uso de CO como única fuente de carbono, todos estos organismos producen al menos dos de estos productos finales.

40

45

Las bacterias anaerobias, tales como las del género Clostridium, se ha demostrado que producen etanol a partir de CO, CO₂ y H₂ a través de la vía 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, las patentes de EE.UU. Nos. 5.173.429, 5.593.886, y 6.368.819, y los documentos WO 98/00558 y WO 02/08438. La bacteria Clostridium autoethanogenum sp también se conoce que produce etanol a partir de gases (Abrini et al., Archives of Microbiology 161, pp 345-351 (1994)).

50

Sin embargo, la producción de etanol por microorganismos mediante la fermentación de gases se asocia típicamente con la co-producción de acetato y/o ácido acético. Como parte del carbono disponible se convierte en acetato/ácido acético en lugar de etanol, la eficiencia de la producción de etanol a partir de tales procesos de fermentación puede ser menor de lo deseable. También, a menos que el subproducto acetato/ácido acético se pueda usar para algún otro propósito, se puede plantear un problema de eliminación de residuos. El acetato/ácido

55

acético se convierte en metano por microorganismos y, por lo tanto, tiene el potencial de contribuir a las emisiones de gases de efecto invernadero.

5 Se sabe que algunas enzimas, que se conoce que están asociadas con la capacidad de los microorganismos de usar monóxido de carbono como su única fuente de carbono y energía, requieren cofactores metálicos para su actividad. Ejemplos de enzimas clave que requieren la unión del cofactor metálico para su actividad incluyen la monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) y la acetil-CoA sintasa (ACS).

10 Los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/058028, WO2009/064200, WO2009/064201 y WO2009/113878 describen procesos que producen alcoholes, especialmente etanol, por 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, cada uno o ambos de los cuales pueden usarse en el proceso de fermentación anaerobia. El documento WO2009/022925 da a conocer el efecto del pH y ORP en la conversión de sustratos que comprenden CO en productos tales como ácidos y alcoholes por fermentación. El documento WO2009/058028 describe el uso de gases de desechos industriales para la producción de productos, tales como alcohol, por fermentación. El documento 15 WO2009/06421 describe vehículos para CO y el uso de CO en fermentación. El documento WO2009/113878 describe la conversión de ácido(s) en alcohol(es) durante la fermentación de un sustrato que comprende CO.

20 Los microbios capaces de crecer en gases que contienen CO son conocidos por hacerlo a un ritmo más lento que él que está asociado tradicionalmente a los microbios cultivados en azúcares. Desde una perspectiva comercial, en un proceso de fermentación, el tiempo requerido para que una población microbiana crezca a una densidad suficientemente alta de células para permitir un nivel económicamente viable del producto que se sintetiza es un costo operativo clave que afecta a la rentabilidad del proceso. Las tecnologías que actúan para mejorar las tasas de crecimientos de cultivos y/o las productividades y que, por lo tanto, reducen el tiempo requerido para alcanzar las densidades celulares deseadas y/o los niveles de producto deseados pueden servir para mejorar la viabilidad comercial del proceso global.

25 En los procesos de fermentación dedicados a la producción de alcoholes a partir de materiales de alimentación de gases, asegurar las condiciones apropiadas para el crecimiento microbiano y/o la producción de alcohol puede ser crítico para mantener un crecimiento microbiano óptimo y/o las productividades de los alcoholes. Por ejemplo, durante la puesta en marcha inicial de una fermentación, el primer objetivo puede ser el crecimiento microbiano. Sin embargo, cuando se logra la densidad microbiana deseada, el primer objetivo puede ser la producción de alcohol. 30 Comprender cómo el perfil del producto cambia en el curso de una fermentación, según ocurre el cambio, particularmente como respuesta a cambios en las condiciones de operación, puede permitir al operador optimizar la productividad.

35 Proporcionar un sustrato que comprenda CO y opcionalmente H₂ en un nivel óptimo, o dentro de un intervalo óptimo para requerimientos particulares, tales como el rápido crecimiento y/o la producción de alcohol, también puede ser complicado. Por ejemplo, demasiado CO puede conducir a una inhibición por CO, como se describe en el documento de EE.UU. 7.285.402. Además, con demasiado poco CO las tasas metabólicas, incluyendo el crecimiento microbiano y la producción de alcohol, pueden disminuir.

El documento WO-A-02/08438 describe un método para producir etanol a partir de la fermentación bacteriana anaeróbica de un sustrato.

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso que va, al menos de alguna manera, hacia la superación de las desventajas anteriores, o al menos proporcionar al público una elección útil.

Sumario de la invención

Se describe un método para la producción de productos que incluyen ácidos y/o alcoholes por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, en el que al menos una porción de un cultivo microbiano convierte:

45 al menos una parte del sustrato que comprende CO en biomasa microbiana; y/o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); y/o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); y/o

ácido(s) y al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

En particular, el cultivo microbiano convierte:

50 al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); y

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

Además, el cultivo microbiano convierte:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); y

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); y

ácido(s) y al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

5 Se describe que el sustrato comprende CO y H₂. Sin embargo, la conversión procede con H₂ insuficiente para la fijación de carbono total en la materia celular y/o los productos. El H₂ se proporciona de tal manera que menos de 2:1 H₂:CO es convertido por el cultivo, tal como aproximadamente 1:1; o aproximadamente 1:2; o aproximadamente 1:3; o aproximadamente 1:4; o aproximadamente 1:5; o aproximadamente 1:10. En realizaciones particulares, no se proporciona H₂.

10 Con la presente invención, se proporciona un método para mejorar la eficiencia de la fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, comprendiendo el método:

a. proporcionar el sustrato a un cultivo microbiano para producir productos seleccionados del grupo que consiste en ácidos, alcoholes y mezclas de los mismos y CO₂ como subproducto.

b. medir la cantidad total del CO consumido y la cantidad del CO₂ producido y calcular una proporción de $\frac{\text{CO}_2 \text{ producido}}{\text{CO}_2 \text{ consumido}}$;

15 c. ajustar la velocidad de suministro del sustrato para mantener la tasa del $\frac{\text{CO}_2 \text{ producido}}{\text{CO}_2 \text{ consumido}}$ dentro de un intervalo predeterminado;

d. repetir las etapas b y c para mantener la tasa del $\frac{\text{CO}_2 \text{ producido}}{\text{CO}_2 \text{ consumido}}$ dentro del intervalo predeterminado.

En realizaciones particulares, la tasa de suministro de sustrato es o bien:

20 i. aumentada si la proporción de CO convertido a CO₂ está determinada a estar por debajo de un valor óptimo o intervalo; o

ii. disminuida si la proporción de CO convertido en CO₂ está determinada a estar por encima de un valor óptimo o intervalo; o

iii. mantenida si la proporción de CO convertido en CO₂ está determinada a estar sustancialmente en un valor óptimo o intervalo.

25 En realizaciones particulares, la tasa de suministro de sustrato se ajusta automáticamente de tal manera que la proporción de CO convertido a CO₂ se mantiene sustancialmente en un valor óptimo o intervalo.

30 En realizaciones particulares, el valor óptimo o intervalo se pueden determinar experimentalmente en base a los productos de fermentación deseados. En realizaciones particulares, en las que el alcohol es el producto deseado, el sustrato se puede proporcionar de tal manera que al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90% del carbono fijo es fijado como el alcohol. Adicional o alternativamente, en el que el producto deseado es el acetato, el sustrato se puede proporcionar de tal manera que al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90% del carbono fijo es fijado como acetato.

35 En realizaciones particulares, la proporción de carbono fijado como producto deseado puede ser mantenida sustancialmente constante. En realizaciones particulares, en las que la proporción de carbono fijado como producto deseado se desvía de un intervalo predeterminado, el suministro del sustrato se controla de tal manera que la proporción se devuelve al intervalo predeterminado. En realizaciones particulares, el intervalo predeterminado es de aproximadamente ± 1%, o aproximadamente ± 2%, o aproximadamente ± 3%, o aproximadamente ± 4%, o aproximadamente ± 5%.

40 En realizaciones particulares, el suministro de sustrato se ajusta automáticamente en respuesta a desviaciones del intervalo predeterminado.

También se describe un método para mejorar la eficiencia de producción de uno o más ácidos y/o alcoholes por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO y, opcionalmente, H₂, en el que al menos una porción del cultivo microbiano es llevado a transición de la conversión de:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); o

45 al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); o

ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es); para la conversión de:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(s); o

ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

5 En realizaciones particulares, al menos una parte del cultivo microbiano puede ser llevado a transición al hacer un ajuste en el cultivo microbiano y/o la corriente de sustrato. En ciertas realizaciones, la fermentación anaeróbica se lleva a cabo en un biorreactor, en el que el cultivo microbiano está al menos parcialmente en suspensión en un caldo de fermentación que comprende un medio nutriente líquido. En realizaciones particulares, al menos una parte del cultivo microbiano puede ser llevado a transición al hacer un ajuste en el caldo de fermentación y/o en el medio nutriente líquido.

10 En ciertas realizaciones, el ajuste incluye uno o más de: cambiar el pH del caldo de fermentación; cambiar el potencial redox del caldo de fermentación; cambiar la concentración de CO del caldo de fermentación; cambiar la composición de la corriente de sustrato; cambiar la presión de la corriente de sustrato; alterar la velocidad de agitación del caldo de fermentación; la retirada del producto; cambiar la concentración del ácido y/o alcohol del caldo de fermentación; cambiar uno o más nutrientes en el medio nutriente líquido; cambiar la tasa de suministro de uno o más nutrientes.

15 En realizaciones particulares de la invención, el sustrato que comprende CO también comprende H₂. En algunas realizaciones, el ajuste puede incluir el cambio de la concentración de H₂ del caldo de fermentación y/o cambiar la relación de CO:H₂ en el caldo de fermentación. En ciertas realizaciones, el sustrato que comprende CO y opcionalmente H₂ es gaseoso. En algunas realizaciones, el ajuste puede incluir el cambio de la presión parcial de CO y/o H₂ en el biorreactor.

20 En realizaciones particulares de la invención, el método incluye determinar la proporción de CO oxidado a CO₂, de modo que puede ser determinada una conversión neta por el cultivo microbiano. En realizaciones particulares, la conversión neta global de la fermentación microbiana es:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); o

ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

25 También se describe un método para mejorar la eficiencia de producción de uno o más ácidos y/o alcoholes por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO bajo parámetros de funcionamiento predeterminados, incluyendo el método la determinación de una proporción de carbono dirigido hacia uno o más productos y dependiendo de la determinación, ya sea:

30 i. hacer un ajuste a uno o más parámetros de funcionamiento, de tal manera que la proporción de carbono fijado como un producto deseado aumente; o

ii. mantener los parámetros de funcionamiento, de manera que la proporción de carbono fijado como producto deseado se mantenga sustancialmente constante.

35 En ciertas realizaciones, el ajuste incluye el cambio de uno o más de los siguientes parámetros de funcionamiento: cambiar el pH del caldo de fermentación; cambiar el potencial redox del caldo de fermentación; cambiar la concentración de CO del caldo de fermentación; cambiar la tasa de suministro de sustrato, cambiar la composición de la corriente de sustrato; cambiar la presión de la corriente de sustrato; alterar la velocidad de agitación del caldo de fermentación; retirada del producto; cambiar la concentración de ácido y/o alcohol del caldo de fermentación; cambiar uno o más nutrientes en el medio nutriente líquido; cambiar la tasa de suministro de uno o más nutrientes.

40 En realizaciones particulares de la invención, el sustrato que comprende CO también comprende H₂. En algunas realizaciones, el ajuste puede incluir el cambio de la concentración de H₂ del caldo de fermentación y/o cambiar la relación de CO:H₂ en el caldo de fermentación. En ciertas realizaciones, el sustrato que comprende CO y opcionalmente H₂ es gaseoso. En algunas realizaciones, el ajuste puede incluir cambiar la presión parcial de CO y/o H₂ en el biorreactor.

45 En realizaciones particulares, el método de mejora de la eficacia incluye la mejora de la velocidad a la que uno o más productos, tales como alcohol, en particular etanol, se producen.

También se describe un método para determinar una conversión global neta en una fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, incluyendo el método la determinación de la proporción del carbono fijado como un producto particular por un cultivo microbiano.

50 En realizaciones particulares, la proporción de carbono fijado como producto particular se puede establecer mediante la determinación de la proporción de CO oxidado a CO₂.

En realizaciones particulares, la conversión neta global en la fermentación microbiana es:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); o

ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es);

En realizaciones particulares, la proporción de CO convertido en CO₂ se determina mediante la medición de CO y opcionalmente el H₂ consumido por el cultivo microbiano y el CO₂ producido por el cultivo microbiano.

5 En ciertas realizaciones, el CO, H₂ y/o CO₂ que entra y/o sale del biorreactor se puede supervisar de manera sustancialmente continua o en puntos de tiempo discretos, tal como antes y/o después de que el ajuste se haya hecho. En algunas realizaciones, las cantidades de CO, CO₂ y/o H₂ que entran y/o salen del biorreactor pueden ser determinadas usando cromatografía de gases. En realizaciones particulares, la cromatografía de gases se utiliza para determinar la proporción de CO convertido en CO₂. En una realización, la cromatografía de gases se lleva a cabo utilizando un micro GC.

10 Se reconoce que las porciones del cultivo microbiano pueden estar involucradas con conversiones alternativas, sin embargo, se puede determinar la conversión neta global mediante todo el cultivo. En realizaciones particulares de la invención en las que el H₂ está sustancialmente limitado, tales como realizaciones en las que una corriente de sustrato comprende menos del 5% de H₂; o menos del 4% de H₂; o menos del 3% de H₂; o menos del 2% de H₂; o menos del 1% de H₂; una relación $\text{CO}_{2\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de 0,5 indica una conversión neta de un sustrato que comprende CO en ácido(s) y opcionalmente las células microbianas. Una relación $\text{CO}_{2\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de 0,667 indica una conversión neta de un sustrato que comprende CO en alcohol(es). Una relación $\text{CO}_{2\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de 0,5-0,667 indica una conversión neta de un sustrato que comprende CO en ácido(s) y alcohol(es) y opcionalmente las células microbianas. Una relación $\text{CO}_{2\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de más de 0,667 indica una conversión neta de un sustrato que comprende CO y ácido(s) en alcohol(es).

15 Se reconoce que en diversas realizaciones, al menos una parte del cultivo microbiano puede convertir el alcohol(es) en ácido(s) y monóxido de carbono. Sin embargo, en realizaciones particulares, la fermentación anaeróbica da como resultados una conversión global neta del sustrato que comprende CO en los productos. En otras realizaciones, en las que $\text{CO}_{2\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ es inferior a 0,5, la conversión neta es alcohol(es) en ácido(s) y la reducción de CO₂ y/o H₂O, que puede ser indeseable.

20 También se describe un sistema para la fermentación microbiana de una corriente de sustrato que comprende CO en productos tales como ácido(s) y/o alcohol(es), que comprende un biorreactor que contiene un cultivo microbiano; medios de medición adaptados para determinar una proporción de carbono fijado como un producto particular y al menos un medio de ajuste adaptado para hacer uno o más ajustes en el cultivo microbiano y/o la corriente de sustrato.

25 En realizaciones particulares, los medios de medición incluyen al menos un medio adaptado para determinar la composición de una corriente de escape que sale del biorreactor y, opcionalmente, la corriente de sustrato que entra en el biorreactor. Los medios de medición pueden estar opcionalmente unidos a un medio de procesamiento de tal manera que la proporción de carbono fijado como producto deseado pueda ser determinada. En una realización, el medio de medición es un cromatógrafo de gases.

30 En ciertas realizaciones, los medios de ajuste están configurados para realizar uno o más ajustes si los medios de determinación determinan que la proporción de carbono fijado como producto deseado se ha desviado de un valor predeterminado o intervalo. En realizaciones particulares, los medios de ajuste están configurados para realizar ajustes por: el cambio del pH del caldo de fermentación; el cambio de potencial redox del caldo de fermentación; el cambio de la concentración de CO del caldo de fermentación; el cambio de la concentración de H₂ del caldo de fermentación; el cambio de la composición de la corriente de sustrato; el cambio de la presión de la corriente de sustrato; la velocidad de agitación del caldo de fermentación; la retirada del producto; el cambio de la concentración de ácido y/o alcohol del caldo de fermentación; el cambio de uno o más nutrientes en el medio nutriente líquido; el cambio de la tasa de suministro de uno o más nutrientes.

35 En realizaciones particulares, el sistema incluye medios de procesamiento adaptados para controlar uno o más medios de ajuste, de manera que uno o más medios de ajuste, tal que uno o más ajuste(s), se pueden hacer para el cultivo microbiano y/o la corriente de sustrato si se determina que la proporción de carbono fijado como producto deseado se ha desviado de un valor predeterminado o intervalo. En otras realizaciones, el sistema puede incluir información visual y/o aural a un operador, de tal manera que el operador puede controlar manualmente los medios de ajuste.

40 En realizaciones particulares, el sustrato comprende un gas obtenido como subproducto de un proceso industrial. En ciertas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en productos de fabricación de metales ferrosos, productos de fabricación no ferrosos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de la biomasa, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbón, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En una realización particular, el sustrato gaseosa comprende un gas obtenido a partir de una fábrica de acero.

45 En ciertas realizaciones, el sustrato comprende de 20% de CO a 100% de CO en volumen, tal como de 40% a 95%

de CO en volumen, tal como de 60% a 90% de CO en volumen, o tal como de 70% a 90% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende 25%, o 30%, o 35%, o 40%, o 45%, o 50% de CO en volumen.

5 Si bien no es necesario que el sustrato contenga ningún hidrógeno, la presencia de H₂ no debe ser perjudicial para la formación del producto de acuerdo con métodos de la invención. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultados la mejora de la eficiencia general de la producción de alcohol. El sustrato gaseoso también puede contener algo de CO₂, por ejemplo, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO₂ en volumen, o de 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen.

En realizaciones particulares, el sustrato que comprende CO es gaseoso.

10 En realizaciones particulares, el alcohol producido por el proceso de fermentación es etanol. La reacción de fermentación también puede producir acetato.

15 En realizaciones particulares, la reacción de fermentación se lleva a cabo por una de más cepas de bacterias carboxidotróficas. Preferiblemente, la bacteria carboxidotrófica se selecciona de Clostridium, Moorella y Carboxydotherrmus, tales como Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, Clostridium ragsdalei, Clostridium carboxydvorans, y Moorella thermoacetica. En una realización, la bacteria carboxidotrófica es Clostridium autoethanogenum.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora en detalle con referencia a las figuras adjuntas en las que:

Fig. 1: es un gráfico que muestra los cambios en la producción de acetato y alcohol y CO₂_{producido}/CO_{consumido} en una fermentación por lotes de un sustrato que comprende CO para producir productos, incluyendo alcohol.

20 Fig. 2: es un gráfico que muestra los cambios en la producción de acetato y alcohol y CO₂_{producido}/CO_{consumido} en una fermentación por lotes de un sustrato que comprende CO para producir productos, incluyendo alcohol.

Fig. 3: es una representación esquemática de un sistema que incluye medios para determinar la relación CO₂_{producido}/CO_{consumido} de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención.

Fig. 4: es un gráfico que muestra la cantidad de CO y H₂ consumidos por un cultivo microbiano del ejemplo 3.

25 Fig. 5: es un gráfico que muestra la producción de metabolito y el crecimiento de un cultivo microbiano del ejemplo 3.

Fig. 6: es un gráfico que muestra la cantidad de CO y consumida por un cultivo microbiano del ejemplo 4.

Fig. 7: es un gráfico que muestra la producción de metabolito y el crecimiento de un cultivo microbiano del ejemplo 4.

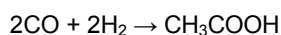
Fig. 8: es un gráfico que muestra la producción de metabolitos en una fermentación continua del ejemplo 5.

Descripción detallada de la invención

30 Las bacterias carboxidotróficas, tales como Clostridium autoethanogenum, producen inesperadamente productos tales como ácido(s) y alcohol(es) por fermentación anaerobia de un sustrato que comprende CO y opcionalmente H₂, por un número de mecanismos diferentes de forma simultánea. Sorprendentemente, se ha reconocido que la producción de ácido(s) y alcohol(es) por microorganismos carboxidotróficos puede ocurrir sin la producción de agua concomitante. En la fermentación anteriormente mencionada de sustratos que comprenden CO y H₂, se consideran
35 productos tales como alcoholes y/o ácidos a ser producido en concierto con agua. Sin embargo, sorprendentemente se ha reconocido que cuando no hay disponible suficiente H₂ para la fijación completa de carbono en la materia celular y los productos, tales como alcoholes y/o ácidos, la fermentación procede sin la producción concomitante de agua. En realizaciones particulares, no hay disponible suficiente H₂ para la fijación completa de carbono cuando H₂ y CO son consumidos por el cultivo microbiano en una relación H₂:CO de menos de 2:1; tal como aproximadamente
40 1:1; o aproximadamente 1:2; o aproximadamente 1:3; o aproximadamente 1:4; o aproximadamente 1:5; o aproximadamente 1:10. En realizaciones particulares, el H₂ está sustancialmente indisponible para el cultivo microbiano.

Sin desear estar limitado por ninguna teoría, los productos tales como el acetato y el etanol son producidos por al menos uno, o al menos dos, o al menos tres o todos los siguientes mecanismos simultáneamente:

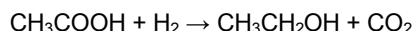
45 1. Fijación de monóxido de carbono en ácido acético



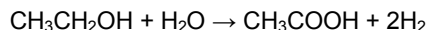
2. Fijación de monóxido de carbono en etanol



3. Reducción de ácido acético en etanol



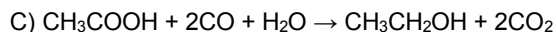
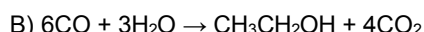
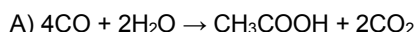
4. Oxidación de etanol en ácido acético



- 5 El anabolismo o acumulación de masa celular microbiana normalmente se produce concomitantemente con al menos el mecanismo 1. Sin embargo, se considera que sólo una pequeña proporción de carbono se dirige al anabolismo en comparación con otros metabolitos.

Además, los microorganismos pueden producir efectivamente su propio H₂ a través de la reacción de desplazamiento del gas del agua ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$). Así, metabolitos, incluyendo acetato y etanol, también se producen de acuerdo con A-C:

10



15 Se reconoce que el cultivo microbiano es dinámico y sin desear estar ligado a ninguna teoría, se considera que el cultivo microbiano convierte al menos una parte del sustrato, que comprende CO y opcionalmente H₂, en los productos de acuerdo con uno o más de 1-3 y A-C, simultáneamente. Así, en el cultivo microbiano dinámico, varios mecanismos diferentes pueden estar ocurriendo dentro del sistema para producir una conversión global neta de CO en alcoholes y/o ácidos. Para determinar cómo se metaboliza CO, la influencia de H₂ y la ponderación de las ecuaciones 1-3 relativas a A-C tienen que ser determinadas. Una vez determinadas, la influencia individual relativa de las ecuaciones 1-3 y A-C se puede establecer mediante la determinación del CO₂ producido, y los H₂ y CO consumidos.

20

Se describe un método para la producción de productos que incluyen ácidos y/o alcoholes por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, en el que al menos una porción de un cultivo microbiano convierte:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s) y células microbianas;

25 y/o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); y/o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); y/o

ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

30 Se ha encontrado sorprendentemente que mediante la determinación de la proporción del CO convertido en CO₂, puede ser desarrollado un sistema de modelado para predecir el perfil de producción de los productos, tales como alcohol y/o ácidos, para bacterias metabolizadoras de CO. Debido a que el grado de oxidación de los productos difiere dependiendo de si las bacterias están sintetizando ácidos orgánicos o alcoholes, la proporción de carbono que las bacterias están dedicando a solventogenesis (tal como la producción de alcohol), se puede predecir sobre la base de la estequiometría de los procesos químicos subyacentes.

35 La comprensión de cómo el perfil del producto de un sistema está cambiando permite realizar ajustes o modificaciones que deban introducirse en las condiciones de funcionamiento de un sistema para promover un resultado deseable, tal como el aumento de la producción de alcohol. Además, en una realización particular, la invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de la fermentación de un sustrato que comprende CO para producir productos, incluyendo alcohol(es) y/o ácido(s), incluyendo el método proporcionar un sustrato a un nivel óptimo o dentro de un intervalo óptimo.

40

En realizaciones particulares, en las que CO se proporciona en ausencia de H₂ o con cantidades limitadas de H₂, la influencia de 1-3 será mínima. Se considera que cantidades limitadas de H₂ están disponibles cuando la proporción de H₂ en una corriente de sustrato es inferior a 5%; tal como menos de 4%; tal como menos de 3%; tal como menos de 2%; tal como menos de 1%. Como tal, la influencia relativa de las ecuaciones A-C se puede establecer mediante el cálculo de una relación de $\text{CO}_2\text{producido}/\text{COconsumido}$ de acuerdo con $y = 2/3x + 0,5$. En tales realizaciones, la ecuación A dará una proporción de 0,5, la ecuación B dará una proporción de 0,667, la ecuación C dará un valor de > 0,667 y la ecuación 4 dará un valor de < 0,5. A partir del valor calculado, la influencia relativa de cada ecuación se puede determinar.

45

Se describe en este documento un método para mejorar la eficiencia de la producción de uno o más ácidos y/o alcoholes por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, en el que al menos una porción de un

50

cultivo microbiano es llevado a transición de la conversión de:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s) y las células microbianas; o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); o

5 ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es);

para la conversión de:

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s) y las células microbianas; o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en ácido(s); o

al menos una parte del sustrato que comprende CO en alcohol(es); o

10 ácido(s) y al menos una porción del sustrato que comprende CO en alcohol(es).

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los siguientes términos como se usan en toda esta memoria se definen como sigue:

15 Las expresiones "aumento de la eficiencia", "mayor eficiencia" y similares, cuando se usan en relación a un proceso de fermentación, incluyen, pero no se limitan a, el aumento de una o más de: la tasa de crecimiento de los microorganismos que catalizan la fermentación, el volumen del producto deseado (tales como alcoholes) producido por volumen de sustrato (tal como el monóxido de carbono) consumido, la velocidad de producción o el nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido comparado con otros sub-productos de la fermentación.

20 La expresión "sustrato que comprende monóxido de carbono" y términos similares debe entenderse que incluye cualquier sustrato en el que el monóxido de carbono está disponible para una o más cepas de bacterias para su crecimiento y/o fermentación, por ejemplo.

25 La expresión "sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" incluye cualquier gas que contiene monóxido de carbono. El sustrato gaseoso contendrá típicamente una proporción significativa de CO, preferiblemente al menos de aproximadamente 5% a aproximadamente 100% de CO en volumen.

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

35 El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías, que incluyen un reactor de tanque agitado continuo (CSTR), un reactor de células inmovilizadas (ICR), un reactor por aspersión (TBR), una columna de burbujas, fermentador de muelle de gas, reactor de membrana tales como biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR), mezclador estático, u otros recipientes u otro dispositivos adecuados para el contacto gas-líquido.

40 A menos que el contexto requiera lo contrario, las frases "fermentación", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, tal como se usan en este documento, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del proceso. Como se describirá adicionalmente en este documento, en algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, la adición de metales o composiciones a una reacción de fermentación debe entenderse que incluye, además de uno o ambos de estos reactores.

45 La expresión "conversión global neta" y similares, tal como se usa en el presente documento, pretende describir la conversión de los sustratos, tales como CO, en los productos, incluyendo el ácido(s) y/o alcohol(es) por un cultivo microbiano en un punto de tiempo particular. Se reconoce que las partes de un cultivo microbiano pueden estar dedicadas a diferentes funciones en un punto de tiempo particular y un número de productos pueden ser producidos. Además, uno o más de los productos presentes en el caldo de fermentación se pueden convertir en otros productos.
50 En consecuencia, la conversión neta global incluye todos los productos producidos por el cultivo microbiano en cualquier punto particular en el tiempo.

- Aunque la siguiente descripción se centra en realizaciones particulares de la invención, a saber, la producción de etanol y/o acetato utilizando CO como el sustrato primario, se debe apreciar que la invención puede ser aplicable a la producción de alcoholes alternativos y/o ácidos y el uso de sustratos alternativos como será conocido por las personas de experiencia ordinaria en la técnica a la que se refiere la invención. Por ejemplo, se pueden usar sustratos gaseosas 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 de uso en la producción de hidrógeno. A modo de ejemplo, estos productos pueden ser producidos por fermentación con microorganismos del género *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina*, y *Desulfotomaculum*.
- Ciertas realizaciones de la invención se adaptan para usar corrientes de gas producidas por uno o más procesos industriales. Tales procesos incluyen los procesos de fabricación de acero, en particular, los 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%). De acuerdo con tales realizaciones, las bacterias acetogénicas se utilizan preferiblemente para producir ácidos y/o alcoholes, en particular etanol o butanol, dentro de uno o más biorreactores. Los expertos en la técnica serán conscientes tras la consideración de la presente descripción que la invención se puede aplicar a varias industrias o corrientes de gas de desecho, incluidos los de los vehículos con un motor de combustión interna. Además, los expertos en la técnica serán conscientes tras la consideración de la presente descripción que la invención puede aplicarse a otras reacciones de fermentación, incluyendo las que utilizan los mismos o diferentes microorganismos.
- La fuente de la corriente de gas no es limitante, con excepción de que al menos un componente del mismo sea utilizable para alimentar a una reacción de fermentación. La invención tiene aplicabilidad particular a la mejora de la captura del carbono en general y/o la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos tales como gases de escape de los automóviles y los gases de combustión industriales que contienen CO en alto volumen.
- Fermentación**
- Se conocen procedimientos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos. Los procesos ejemplares incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, la patente de EE.UU. No. 6.340.581, la patente de EE.UU. No. 6.136.577, la patente de EE.UU. No. 5.593.886, la patente de EE.UU. No. 5.807.722 y la patente de EE.UU. No. 5.821.111.
- Se conoce un cierto número de bacterias anaeróbicas que son capaces de llevar a cabo la fermentación de CO a alcoholes, incluyendo n-butanol y etanol, y ácido acético, y que son adecuadas para su uso en el procedimiento de la presente invención. Ejemplos de tales bacterias que son adecuadas para su uso en la invención incluyen las del género *Clostridium*, tales como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo las descritas en los documentos WO 00/68407, EP 117309, las patentes de EE.UU. Nos. 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: pp. 2085-2091), *Clostridium ragsdalei* (documento WO/2008/028055) y *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al, *Archives of Microbiology* 161: pp 345-351). Otras bacterias adecuadas incluyen las del género *Moorella*, incluyendo *Moorella* sp HUC22-1, (Sakai et al, *Biotechnology Letters* 29: pp 1607-1612), y las del género *Carboxydotherrum* (Svetlichny, VA, Sokolova, TG et al (1991), *Systematic and Applied Microbiology* 14: 254-260). Otros ejemplos 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. pp. 41-65). Además, se debe entender que otras bacterias anaeróbicas acetogénicas pueden ser aplicables a la presente invención tal como se comprendería por cualquier persona de experiencia en la técnica. También se apreciará que la invención se puede aplicar a un cultivo mixto de dos o más bacterias.
- Un ejemplo de microorganismo adecuado para uso en la presente invención es *Clostridium autoethanogenum*. En una realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificativas de la cepa depositada en el Centro de Recursos Alemán para el Material Biológico (DSMZ) bajo el número de depósito identificable 19630. En otra realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características de identificación del número de depósito DSMZ DSMZ 10061.
- El cultivo de las bacterias utilizadas en los métodos de la invención se puede realizar usando cualquier número de procedimientos conocidos en la técnica para el cultivo y la fermentación de sustratos utilizando bacterias anaerobias. Se proporcionan técnicas ejemplares en la sección "Ejemplos" más abajo. A modo de ejemplo adicional, pueden ser utilizados aquellos procedimientos descritos en general en los siguientes artículos utilizando 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 continuo de tanque agitado (CSTR), un reactor de células inmovilizadas, un reactor por aspersión, un reactor de columna de burbujas (BCR), un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueva (HFMBR) o un reactor de lecho percolador (TBR). Además, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que los microorganismos se cultivan, y un segundo reactor, reactor fermentador, al que el caldo de fermentación del reactor de crecimiento se alimenta y en el que se produce la mayor parte del producto de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato).

De acuerdo con diversas realizaciones de la invención, la fuente de carbono para la reacción de fermentación es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como un subproducto de un proceso industrial, o de alguna otra fuente, tal como de los gases de escape de los automóviles. En ciertas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de productos de metales ferrosos, tales como las fábricas de acero, la fabricación de los productos no ferrosos, los procesos de refinado del petróleo, la gasificación del carbón, la producción de energía eléctrica, la producción de negro de carbono, la producción de amoníaco, la producción de metanol y la fabricación de coque. En estas realizaciones, el sustrato que contiene CO puede ser capturado desde el proceso industrial antes de que se emita a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO, también puede ser deseable tratar para eliminar las impurezas no deseadas, tales como las partículas de polvo antes de introducirlo a la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede ser filtrado o limpiado usando métodos conocidos.

Como alternativa, el sustrato que contiene CO puede proceder de la gasificación de la biomasa. El proceso de gasificación implica la combustión parcial de la biomasa en un suministro limitado de aire u oxígeno. El gas resultante típicamente comprende principalmente CO y H₂, con volúmenes mínimos de CO₂, metano, etileno y etano. Por ejemplo, los subproductos de la biomasa obtenidos durante la extracción y el procesamiento de productos alimenticios tales como el azúcar de la caña de azúcar o el almidón de maíz o granos, o residuos de biomasa no alimentaria generados por la industria forestal, pueden gasificarse para producir un gas que contiene CO adecuado para su uso en la presente invención.

El sustrato que contiene CO contendrá típicamente una proporción importante de CO, tal como al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 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 realizaciones particulares, el sustrato comprende 25%, o 30%, o 35%, o 40%, o 45%, o 50% de CO en volumen. Los sustratos que tienen concentraciones más bajas de CO, tal como 6%, también pueden ser apropiados, particularmente cuando H₂ y CO₂ también están presentes.

Si bien no es necesario que el sustrato contenga ningún hidrógeno, la presencia de H₂ no debe ser perjudicial para la formación de producto de acuerdo con los métodos de la invención. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una mejora de la eficiencia general de la producción de alcohol. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el sustrato puede comprender hasta una relación de 2:1, o 1:1, o 1:2 de H₂:CO. En otras realizaciones, la corriente de sustrato comprende concentraciones bajas de H₂, por ejemplo, menos de 5%, o menos del 4%, o menos de 3%, o menos del 2%, o menos de 1%, o está sustancialmente libre de hidrógeno. El sustrato también puede contener algo de CO₂, por ejemplo, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO₂ en volumen, o de 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen.

Típicamente, el monóxido de carbono se añade a la reacción de fermentación en estado gaseoso. Sin embargo, los métodos de la invención no se limitan a la adición del sustrato en este estado. Por ejemplo, el monóxido de carbono se puede proporcionar en un líquido. Por ejemplo, un líquido puede estar saturado con un gas que contiene monóxido de carbono y aquel líquido añadido al biorreactor. Esto se puede conseguir usando la metodología estándar. A modo de ejemplo, un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; *Applied Biochemistry and Biotechnology* Volume 101, Number 3/October, 2002) podría utilizarse para este propósito.

Se apreciará que para que ocurra el crecimiento de las bacterias y la fermentación de CO en alcohol, además del gas sustrato que contiene CO, tendrá que ser alimentado al biorreactor un medio nutriente líquido adecuado. Un medio nutriente contiene vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo utilizado. Los medios anaerobios adecuados para la fermentación de etanol utilizando CO como única fuente de carbono son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los medios adecuados se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 5.173.429 y 5.593.886 y en los documentos WO 02/08438, WO2007/115157 y WO2008/115080 mencionados anteriormente. Se describen en este documento un nuevo medio que ha incrementado la eficacia para apoyar el crecimiento de los microorganismos y/o la producción de alcohol en el proceso de fermentación. Este medio se describirá con más detalle más adelante.

La fermentación deseablemente debe llevarse a cabo en condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación deseada (por ejemplo, de CO a etanol). Las condiciones de reacción que se deben considerar incluyen

la presión, la temperatura, el caudal de gas, el caudal de líquido, el pH del medio, el potencial redox del medio, la velocidad de agitación (si se utiliza un reactor continuo de tanque agitado), el nivel de inóculo, las concentraciones máximas de sustrato gas para asegurar que el CO en la fase líquida no se convierta en limitante, y las concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición del producto. Las condiciones adecuadas se describen en los documentos WO02/08438, WO07/117157 y WO08/115080.

Las condiciones óptimas de reacción dependerán en parte del microorganismo particular utilizado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se lleve a cabo a presión superior a la presión ambiente. Operar en aumento de la presión permite un aumento significativo en la tasa de transferencia de CO de la fase gaseosa a la fase líquida donde puede ser absorbido por el microorganismo como fuente de carbono para la producción de etanol. Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen de líquido en el biorreactor dividido por el caudal de gas de entrada) se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a una presión elevada en lugar de a la presión atmosférica.

También, puesto que la tasa de conversión dada de CO a etanol es en parte una función del tiempo de retención del sustrato, y la consecución de un tiempo de retención deseado a su vez determina el volumen requerido del biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir considerablemente el volumen del biorreactor que se requiere, y en consecuencia el coste de capital del equipo de fermentación. De acuerdo con los ejemplos dados en la patente de EE.UU. No. 5.593.886, el volumen del reactor puede ser reducido en proporción lineal a los incrementos en la presión de funcionamiento del reactor, es decir, biorreactores operados a 10 atmósferas (10^6 Pa) de presión sólo necesitan ser un décimo del volumen de los operados a 1 atmósfera (10^5 Pa) de presión.

Los beneficios de la realización de la fermentación de gas a etanol a presiones elevadas también se han descrito en otras partes. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas bajo presiones de 30 psig (2×10^5 Pa) y 75 psig (5×10^5 Pa), dando productividades de etanol de 150 g/l/día y 369 g/l/día, respectivamente. Sin embargo, se encontró que ejemplos de fermentaciones llevadas a cabo utilizando medios similares y composiciones de gas de entrada a presión atmosférica producían 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 que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no se convierte en limitante. Esto se debe a que una consecuencia de las condiciones limitadas del CO puede ser que el producto de etanol sea consumido por el cultivo.

Recuperación del producto

Los productos de la reacción de fermentación se pueden recuperar usando procedimientos conocidos. Los métodos ejemplares incluyen los descritos en los documentos WO07/117157, WO08/115080, las patentes de EE.UU. Nos. 6.340.581, 6.136.577, 5.593.886, 5.807.722 y 5.821.111. Sin embargo, brevemente y a modo de ejemplo solamente el etanol se puede recuperar del caldo de fermentación por métodos tales como la destilación fraccionada o la evaporación, y la fermentación extractiva.

La destilación de etanol a partir del caldo de fermentación produce una mezcla azeotrópica de etanol y agua (es decir, 95% de etanol y 5% de agua). El etanol anhidro, posteriormente, se puede obtener a través del uso de la tecnología de deshidratación de etanol por tamiz molecular, que también es bien conocida en la técnica.

Los procedimientos de fermentación extractiva implican el uso de un disolvente miscible en agua que presenta un bajo riesgo de toxicidad para el organismo de fermentación, para recuperar el etanol del caldo diluido de fermentación. Por ejemplo, el alcohol oleico es un disolvente que puede utilizarse en este tipo de proceso de extracción. El alcohol oleico se introduce continuamente en un fermentador, después de lo cual este disolvente se eleva formando una capa en la parte superior del fermentador que se extrae continuamente y se alimenta a través de una centrífuga. El agua y las células se separan después fácilmente a partir del alcohol de oleilo y se devuelven al fermentador mientras que el disolvente etanol cargado se introduce en una unidad de vaporización instantánea. La mayor parte del etanol se vaporiza y se condensa mientras que el alcohol de oleilo no es volátil y se recupera para su reutilización en la fermentación.

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

Por ejemplo, se puede usar un sistema de adsorción que implique un filtro de carbón activado. 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 la generación de un caldo de fermentación libre de células para la recuperación del producto son conocidos en la técnica. El etanol sin células, y el acetato, que contiene el permeado se hace pasar entonces a través de una columna que contiene carbón activado para adsorber el acetato. El acetato en la forma de ácido (ácido acético) en lugar de en la forma de sal (acetato) se adsorbe más fácilmente por el carbón activado. Por lo tanto, se prefiere que el pH del caldo de fermentación se reduzca hasta menos de aproximadamente 3 antes de que se pase por la columna de carbón activado, para convertir la mayoría del acetato a la forma de ácido acético.

El ácido acético adsorbido en el carbón activado se puede recuperar mediante elución usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el etanol puede ser utilizado para eluir el acetato ligado. En ciertas realizaciones, el etanol producido por el proceso de fermentación en sí mismo puede ser utilizado para eluir el acetato. Debido a que el punto de ebullición del etanol es 78,8°C y el del ácido acético es 107°C, el etanol y el acetato pueden ser separados fácilmente uno del otro mediante un método basado en la volatilidad, tal como por destilación.

Otros métodos para recuperar el acetato del caldo de fermentación son también conocidos en la técnica y pueden ser utilizados en los procesos de la presente invención. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 6.368.819 y 6.753.170 describen un sistema de disolventes y co-disolventes que se puede utilizar para la extracción de ácido acético a partir de caldos de fermentación. Al igual que con el ejemplo del sistema de base de alcohol olefínico descrito para la fermentación extractiva de etanol, los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 6.368.819 y 6.753.170 describen un disolvente inmiscible en agua/co-disolvente que se puede mezclar con el caldo de fermentación, ya sea en presencia o ausencia de los microorganismos fermentados con el fin de 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 entonces ser utilizada para purificar el ácido acético a partir del sistema disolvente/co-disolvente.

Los productos de la reacción de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato) se pueden recuperar del caldo de fermentación mediante la eliminación continua de una parte del caldo del biorreactor de fermentación, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración), y recuperando uno o más productos del caldo de forma simultánea o secuencial. En el caso del etanol, puede ser convenientemente recuperado por destilación, y el acetato puede ser recuperado por adsorción sobre carbón activado, utilizando los métodos descritos anteriormente. Las células microbianas separadas se devuelven preferiblemente al biorreactor de fermentación. El permeado exento de células restantes, después de que el etanol y el acetato se hayan eliminado, también se devuelve preferiblemente al biorreactor de fermentación. Se pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitaminas del grupo B) al permeado exento de células para reponer el medio de nutrientes antes de que se devuelva al biorreactor. Además, si el pH del caldo se ajustó como se describió anteriormente para mejorar la adsorción de ácido acético por el carbón activado, el pH se debe volver a ajustar a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de ser devuelto al biorreactor.

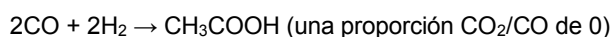
Determinación de la fijación de carbono en la fermentación

Mediante la determinación de la proporción del CO convertido en CO₂, se ha diseñado un sistema de modelado para predecir el perfil de producción de los productos para una bacteria que metaboliza CO. Dado que el grado de oxidación de los productos difiere dependiendo de si las bacterias están sintetizando ácidos orgánicos o alcoholes, la proporción de carbono que las bacterias están dedicando a solventogenesis se puede predecir sobre la base de la estequiometría de los procesos químicos subyacentes. El análisis y/o la cuantificación del grado de los subproductos oxidados (CO₂) proporcionan efectivamente una indicación en tiempo real de la conversión total del producto por un cultivo microbiano:

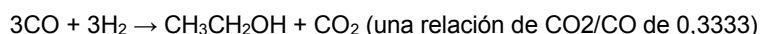
El sistema modela el estado del reactor como un compuesto de uno o más estados "ideales" tal como se calcula a partir de la estequiometría subyacente. El sistema de modelado asigna una muestra de gas específica en un compromiso del "mejor ajuste" entre dos estados primarios y una condición de modificación que genera dos reacciones secundarias híbridas dependiendo del hidrógeno disponible, y dos estados terciarios.

Los estados principales son:

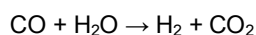
Fijación de monóxido de carbono en ácido acético



Fijación de monóxido de carbono en etanol



En ausencia de gas hidrógeno libre, ambas de estas reacciones primarias se completan con una reacción de desplazamiento de agua-gas;



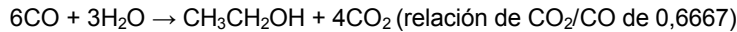
Se puede suponer que este desplazamiento de agua-gas se produce simultáneamente con la fijación de carbono cuando la fijación de carbono se lleva a cabo en ausencia de hidrógeno libre.

Combinando el desplazamiento de agua-gas con las dos reacciones primarias da un par de reacciones secundarias híbridas que se producen en ausencia de gas hidrógeno libre.

Fijación de monóxido de carbono en ácido acético en ausencia o libre de hidrógeno



Fijación de monóxido de carbono en etanol en ausencia de hidrógeno libre

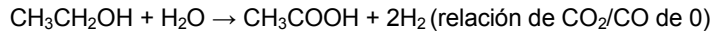


Además, hay dos estados terciarios potenciales;

Reducción de ácido acético a etanol



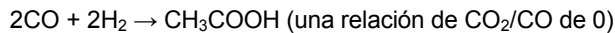
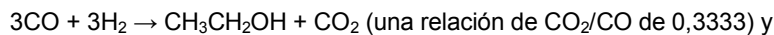
Oxidación de etanol a ácido acético



10 Mediante la observación de la proporción de $\text{CO}_{2(\text{producido})}/\text{CO}_{(\text{consumido})}$, el estado del cultivo puede deducirse y su salida de producto puede ser calculada. En una cultura con 100% de carácter de consumo de hidrógeno, la relación va a variar entre 0 y 1/3. Esto se puede representar gráficamente como una función lineal con la ecuación $y = 1/3x$. En un cultivo con 100% de carácter de desplazamiento de agua-gas, la relación puede variar entre 1/2 y 2/3, que también puede ser representada gráficamente como una función lineal con la ecuación $y = 2/3x + 0,5$.

15 Cuando el consumo de hidrógeno es despreciable, la primera función lineal puede ser ignorada con eficacia a efectos de modelado y resolviendo sólo la segunda ecuación, utilizando el valor CO_2/CO observado, el valor de x calculado será la proporción de carbono dirigido a la producción de etanol. Restando el total de CO_2 liberado de la aportación total de carbono dará el carbono disponible para la fijación, multiplicando esto por la proporción calculada anteriormente da el carbono predicho fijado como etanol. Dado que dos átomos de carbono están fijados en una molécula de etanol, este valor debe reducirse a la mitad para convertir los moles de carbono entrada en moles de etanol de salida.

20 Cuando el consumo de hidrógeno no es insignificante, pero es insuficiente para la fijación de carbono completa en productos y/o materia celular, ni la relación CO_2/CO ni la cantidad de hidrógeno se pueden usar para inferir directamente el estado del cultivo. La producción de etanol a partir de hidrógeno ocupa un continuo entre



25 Ambas utilizan CO y H2 en una relación 1:1. Sin conocer la posición de este continuo ocupado por la parte que consume hidrógeno del cultivo microbiano, la salida relativa de CO_2 por los microorganismos que consumen hidrógeno se desconoce. Una proporción exacta global de CO_2/CO no se puede calcular sin conocer el CO_2 producido por el desplazamiento de gas de agua que subyace en la utilización de la población, y esa cifra no se puede calcular sin saber con exactitud la relación CO_2/CO de los consumidores de hidrógeno y la cantidad relativa de CO_2 que están produciendo.

30 Sin embargo, esto puede evitarse teniendo en cuenta que en un estado que consume hidrógeno, el consumo de H_2 equivale al consumo de CO y la segunda ecuación de estado también puede ser una relación de CO_2/H_2 , representada como un valor z en lugar de un valor de x ;

$$y = 2/3x + 0,5$$

35 y

$$y = 1/3z$$

40 Sin embargo, sin la tercera ecuación para vincular x y z , la ecuación simultánea no se puede resolver. Debido a que el estado del cultivo puede cambiar, esta tercera ecuación; $y = ax + bz$ es, de hecho, variable, como es de esperar dado que el grado en el que un cultivo produce acetato o etanol durante el curso de una fermentación, cambia con las condiciones.

45 En la circunstancia de que un cultivo consuma totalmente el hidrógeno, tanto las relaciones de CO_2/CO como de CO_2/H_2 serían iguales, ya que el consumo de CO sería 1:1 con el consumo de hidrógeno. De esto se puede inferir que una línea trazada entre el punto calculado con la relación de CO_2/CO y la relación CO_2/H_2 tenderá hacia la horizontal cuando el carácter consumidor de hidrógeno de la población de microbios aumente, y que la intersección del eje z sería directamente proporcional a la proporción de carbono que se fija en etanol cuando la línea es totalmente horizontal, como en un estado de alimentación de hidrógeno, CO_2 se produce en una base 1:1 con etanol.

A partir de esta información, puede ser añadida una aproximación para permitir que la tercera ecuación "híbrida" sea calculada.

50 La pendiente de la recta entre la relación de CO_2/CO y CO_2/H_2 se utiliza para asignar una ponderación a la

intersección z de esta línea híbrida; si esta línea era horizontal, la pendiente ($[\text{CO}_2/\text{CO}]/[\text{CO}_2/\text{H}_2]$) sería de 1, lo que indica un cultivo de consumo de hidrógeno puro, en el que toda la producción de etanol viene de los consumidores de hidrógeno, es decir, la única ecuación que tiene que tenerse en cuenta es la ecuación de hidrógeno.

5 A medida que se desplace esta línea de horizontal, su pendiente ($[\text{CO}_2/\text{CO}]/[\text{CO}_2/\text{H}_2]$) tenderá hacia cero. Usando esto como un valor de ponderación multiplicativo para multiplicar por la intersección z, la cantidad deducida de CO_2 (y etanol) producida por los consumidores de hidrógeno tenderá asimismo a cero a medida que la línea entre las relaciones de CO_2/CO y CO_2/H_2 se mueve más y más lejos desde la horizontal.

10 La intersección z multiplicada con el factor de ponderación derivado de la pendiente da una aproximación del CO_2 global producido por los microorganismos que consumen hidrógeno y el CO consumido por los consumidores de hidrógeno será de 1:1 con el consumo de hidrógeno, y este valor a continuación, puede ser sustituido para resolver la ecuación $y = 1/3x$. El CO consumido y el CO_2 producido por los microorganismos que consumen hidrógeno puede restarse del consumo y de la producción para dar el CO restante y el CO_2 del que la población de desplazamiento de agua-gas es responsable, y la relación de este resto puede ser sustituida para resolver la ecuación $y = 2/3x + 0,5$. Así, se puede determinar la proporción de carbono fijado en un producto particular, tal como ácido(s) y/o alcohol(es).

15 Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad de CO y opcionalmente H_2 consumidos y el CO_2 producido se pueden monitorizar de forma continua o en puntos de tiempo discretos, cuando se desee. Cualquier medio conocido en la técnica puede ser usado para determinar la cantidad de CO_2 , CO y H_2 ; sin embargo, en una realización de la invención, la cromatografía de gases (GC) se utiliza para medir la cantidad de CO_2 , CO y H_2 presente en una corriente de escape que sale de un biorreactor. La proporción de carbono fijado como alcohol y/o ácido se puede
20 calcular si se conoce la composición de la corriente de sustrato que entra en el biorreactor. Si la composición de la corriente de sustrato es desconocida, se puede utilizar un cromatógrafo de gases adicional para determinar la composición. Otros medios para determinar la cantidad de CO_2 producido y el sustrato consumido incluyen la espectroscopia de masas (MS), GC-MS y sensores en línea.

25 Así, de acuerdo con la invención, la proporción de carbono fijado como un producto particular, tal como acetato y/o etanol se puede determinar mediante la medición del CO_2 producido, el CO consumido y el H_2 opcionalmente consumido. Se reconoce que la velocidad a la que el sustrato (por ejemplo CO y, opcionalmente, H_2) se pone a disposición en un cultivo microbiano puede afectar a la proporción relativa de los productos, así como a la velocidad a la que se producen. Por ejemplo, el aumento del suministro de sustrato a un cultivo productor de etilo puede aumentar la proporción de carbono dirigida a la producción de alcohol.

30 Un sustrato que comprende CO y opcionalmente H_2 se proporciona típicamente en forma gaseosa y la disponibilidad de CO y H_2 a un cultivo microbiano será dependiente de las propiedades de transferencia de masa del sistema de fermentación. Por ejemplo, la disponibilidad de CO y/o H_2 de un cultivo microbiano en suspensión en un caldo de fermentación depende de factores conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo la temperatura, la composición de caldo, la tasa de suministro de gas, la composición del gas, la presión de vapor de CO, la presión
35 de vapor de H_2 , la mezcla. Por lo tanto, el aumento de la disponibilidad de CO y/o H_2 a una fermentación microbiana requiere mejorar las propiedades de transferencia de masa del sistema, tales como el aumento de la tasa de suministro de sustrato y/o el aumento de la agitación de un biorreactor agitado mecánicamente.

40 De acuerdo con los métodos de la invención, la eficiencia de la fermentación puede mejorarse proporcionando el sustrato que comprende CO y opcionalmente H_2 en, o hacia, un nivel óptimo o intervalo. Un nivel óptimo puede determinarse sobre la base de los productos deseados de la fermentación. Por ejemplo, si se desean alcohol y crecimiento microbiano, el sustrato que comprende CO y opcionalmente H_2 se puede suministrar de tal manera que el carbono sea fijado predominantemente como alcohol, mientras que una parte está disponible para el crecimiento microbiano. Por ejemplo, un sustrato que comprende CO puede ser suministrado a un cultivo microbiano, de manera que se producen el crecimiento microbiano y la producción de alcohol.

45 Las condiciones, en particular la tasa de suministro de sustrato y/o las concentraciones de CO y H_2 relativas, pueden ser variadas hasta que el crecimiento microbiano y la producción de alcohol se hayan optimizado según convenga al operador. Dado que se puede determinar la influencia de cada vía de fijación de carbono en los productos, el suministro de sustrato se puede ajustar para alcanzar y/o mantener las condiciones deseables durante la fermentación. Por ejemplo, se reconoce que una corriente de sustrato puede comprender la fluctuación de los
50 componentes de CO y/o H_2 . Sin embargo, usando los métodos de la invención, la producción neta de los productos se puede mantener en una relación sustancialmente constante mediante el ajuste del suministro de sustrato.

Adicional o alternativamente, cuando un cultivo microbiano crece, o la densidad microbiana fluctúa, el suministro de sustrato puede ser alterado de acuerdo con los requisitos de los cultivos microbianos basado en la determinación del CO_2 producido y del CO y H_2 consumidos.

55 En este sentido, la proporción de carbono dirigida a un producto particular se puede mantener sustancialmente constante a pesar de los cambios del sustrato de alimentación y/o de la densidad microbiana. En realizaciones particulares de la invención, la proporción de carbono dirigido a un producto particular puede ser seleccionada por un operador y las condiciones ser ajustadas para mantener la proporción sustancialmente constante. Por ejemplo, si

un operador requiere un 90% del carbono fijado dirigido hacia la producción de etanol, el sustrato se puede suministrar de tal manera que la proporción no se desvíe fuera de un intervalo predeterminado, tal como $\pm 1\%$, o $\pm 2\%$, o $\pm 3\%$ o $\pm 4\%$, o $\pm 5\%$. En realizaciones particulares, el suministro de sustrato puede ser controlado en respuesta a la determinación de la proporción del carbono dirigido a un producto particular. En realizaciones

5

particulares, el suministro de sustrato se ajusta automáticamente en respuesta a los cambios en la proporción de carbono dirigido a un producto particular.

En realizaciones particulares, en las que se suministra CO en ausencia de cantidades apreciables de H₂, se puede determinar la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$. En realizaciones particulares de la invención, el crecimiento microbiano y la producción de alcohol se pueden optimizar cuando se produce acetato al mismo tiempo. Como tal,

10

15

se esperaría una relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ de $<0,667$, tal como aproximadamente 0,66, o aproximadamente 0,65, o aproximadamente 0,64, o aproximadamente 0,63, o aproximadamente 0,62, o aproximadamente 0,61, o aproximadamente 0,60, o menos. Alternativamente, el crecimiento microbiano y la producción de alcohol pueden ser óptimos cuando se consume acetato. Como tal, se espera una proporción $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ de $>0,667$, tal como aproximadamente 0,67, o aproximadamente 0,68, o aproximadamente 0,69, o aproximadamente 0,70 o mayor.

Una vez que se ha determinado el nivel óptimo o intervalo, la fermentación, o las fermentaciones futuras pueden ser operadas en condiciones similares, en las que el sustrato se suministra de tal manera que el carbono determinado experimentalmente fijado y/o la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se mantiene sustancialmente. La proporción óptima de la fermentación de un sustrato que comprende CO y H₂ puede ser determinada y se aplica de manera similar.

20

En una realización adicional o alternativa, puede ser usado un método para indicar cuándo y/o cómo un cultivo microbiano puede o debe ser llevado a transición de una conversión global neta a otra. Por ejemplo, como se señaló anteriormente, si el crecimiento es el objetivo principal, entonces el cultivo microbiano puede mantenerse deseablemente de tal manera que la mayoría del carbono se dirige hacia la producción de acetato. Por ejemplo, una corriente de sustrato que comprende CO y H₂ mínimo o ninguno, la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se mantiene

25

30

alrededor de 0,5. Si la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se desvía más allá de un intervalo o umbral predeterminado, tal como aproximadamente 0,45-0,55, o aproximadamente 0,48-0,52, se puede hacer un ajuste al cultivo y/o a la corriente de sustrato para pasar al menos una parte del cultivo microbiano de tal manera que la conversión neta global por todo el cultivo sea como se desee. Por ejemplo, una transición de cultivo tal que la relación CO₂/CO sea de aproximadamente 0,5. En presencia de H₂, se pueden hacer ajustes equivalentes de manera similar, de manera que la fijación de carbono permanezca sustancialmente constante.

En realizaciones particulares, al menos una parte del cultivo microbiano puede ser llevado a transición haciendo un ajuste en el cultivo microbiano y/o la corriente de sustrato. En ciertas realizaciones, la fermentación anaeróbica se lleva a cabo en un biorreactor, en el que el cultivo microbiano es al menos parcialmente suspendido en un caldo de fermentación que comprende un medio nutriente líquido. En realizaciones particulares, al menos una parte del

35

cultivo microbiano puede ser llevado a transición al hacer un ajuste en el caldo de fermentación y/o en el medio nutriente líquido.

En ciertas realizaciones, el ajuste incluye uno o más de: cambio de pH del caldo de fermentación; cambio de potencial redox del caldo de fermentación; cambio de la concentración de CO del caldo de fermentación; cambio de la concentración de H₂ del caldo de fermentación; cambio de la composición de la corriente de sustrato; cambio de presión de la corriente de sustrato; alteración de la velocidad de agitación del caldo de fermentación; retirada del producto; cambio de la concentración del ácido y/o alcohol del caldo de fermentación; cambio de uno o más nutrientes en el medio nutriente líquido; cambio de la tasa de suministro de uno o más nutrientes.

40

Adicional o alternativamente, si la producción de alcohol es el objetivo primario entonces el sustrato se puede proporcionar de tal manera que sustancialmente todo el carbono se fije como etanol. En realizaciones particulares,

45

50

en las que no hay ningún H₂ disponible, la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ puede ser mantenida de manera deseable a aproximadamente 0,667. Si la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se desvía más allá de un intervalo predeterminado o umbral, tal como de 0,58 a 0,73 o de 0,63 a 0,7, se puede hacer un ajuste al cultivo y/o la corriente de sustrato para llevar la transición a al menos una parte del cultivo microbiano de tal manera que la conversión neta global por todo el cultivo sea como se desee, por ejemplo, devuelta a una relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ de aproximadamente 0,667.

En una realización adicional o alternativa, un cultivo productor de alcohol mantenido con una relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ de aproximadamente 0,667 puede tener cantidades significativas de acetato no deseado, por ejemplo, el acetato residual que queda de una fase de crecimiento anterior. El acetato se puede convertir en alcohol por la transición de al menos una parte de la reducción de acetato a alcohol (ecuación 3). Como tal, el cultivo se puede ajustar hasta que la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ aumente por encima de 0,667 hasta que la conversión deseada se haya completado.

55

La proporción de CO oxidado en CO₂ se puede utilizar para determinar la conversión neta global de un cultivo microbiano. La cantidad de CO consumido por el cultivo también proporciona una indicación de la viabilidad del cultivo (captación específica: velocidad de absorción de CO/densidad de las células). En consecuencia, los métodos

de la invención se pueden usar en combinación con la monitorización de la captación específica. Por ejemplo, si la proporción de carbono fijado como un producto en particular y/o la captación específica se desvían de umbrales o intervalos predeterminados, se pueden hacer uno o más ajustes al cultivo de tal manera que se mantengan la viabilidad y la conversión deseada. En realizaciones particulares, en las que H₂ está limitado o está sustancialmente no disponible, se espera que la absorción de CO específico sea de al menos 0,5 mmol/gramos de células microbiana en peso seco/minuto (mmol/g/min), tal como aproximadamente 0,6 mmol/g/min, tal como aproximadamente 0,7 mmol/g/min, tal como aproximadamente 0,8 mmol/g/min, tal como aproximadamente 0,9 mmol/g/min, tal como aproximadamente 1,0 mmol/g/min.

En este sentido, la proporción de carbono fijado como producto particular en combinación con la absorción específica de CO se puede utilizar para determinar la velocidad a la que determinados metabolitos deseados, tales como ácidos y/o alcoholes, se producen. En realizaciones particulares, el método se puede utilizar para mejorar la eficiencia de la fermentación microbiana mediante la optimización (es decir, la mejora) de la velocidad a la que se producen uno o más productos (tales como alcoholes). Por ejemplo, la producción de etanol puede mejorarse haciendo uno o más ajustes en el cultivo microbiano que aumenten la absorción específica de CO, mientras que se mantiene una relación de $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de aproximadamente 0,667. Adicional o alternativamente, se pueden hacer uno o más ajustes para aumentar la captación de CO y la relación de $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de (por ejemplo) 0,5 a (por ejemplo) 0,667 para mejorar la tasa de producción de alcohol.

En realizaciones particulares de la invención, la fermentación continua de sustratos que comprenden CO y opcionalmente H₂ se puede lograr durante largos períodos de al menos 2 días, tal como al menos 3 días, o por lo menos 5 días, o por lo menos 1 semana, o al menos 1 mes. La fermentación continua incluye proporcionar medio fresco a un caldo de fermentación y extraer el caldo de fermentación que contiene los productos y las células microbianas para mantener un caldo de fermentación de volumen sustancialmente constante. En realizaciones particulares, las concentraciones de los productos, incluyendo alcohol(es) y opcionalmente ácido(s) y las células microbianas se mantienen sustancialmente constantes en el proceso continuo. En realizaciones particulares de la invención, para mantener una fermentación continua durante un período prolongado, el cultivo microbiano fija al menos una parte del carbono como ácido, tal como acetato. El acetato puede producirse a una concentración de menos de 5 g/L. Sin embargo, de acuerdo con los métodos de la invención, la mayoría del carbono fijado se fija como alcohol, tal como etanol, en exceso de 10 g/L, o 15 g/L. Por lo tanto, para mantener la operación continua, el sustrato debe proporcionarse de tal manera que el carbono se fije como acetato, etanol y biomasa.

En una realización particular, se mantiene una fermentación que produce etanol y pequeñas cantidades de acetato de forma continua durante un período prolongado dentro de un intervalo de relaciones $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ de aproximadamente 0,61 a 0,65; tal como entre 0,62 y 0,64. Tal relación $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ asegura que una mayoría del carbono fijado se dirige hacia la producción de alcohol, mientras que una cantidad menor se dirige hacia el acetato y la materia celular para mantener el crecimiento microbiano, manteniendo así un cultivo continuo. En realizaciones particulares, se proporciona el sustrato tal que la absorción de CO específico se mantiene al menos 0,8 mmol/g/min, tal como aproximadamente 1,0 mmol/gramo de masa de células secas/minuto.

De acuerdo con otra realización, puede llevarse a cabo una fermentación no continua (por lotes) de tal manera que el alcohol se produzca sin la producción de ácido concomitante. En tales realizaciones, el sustrato se suministra de tal manera que se produzcan el alcohol y, opcionalmente, la materia celular (biomasa). De acuerdo con la invención, se proporciona el sustrato tal que se mantenga una relación CO_2/CO de aproximadamente 0,667. Se reconoce que cuando el cultivo microbiano crece, la cantidad de CO (y, opcionalmente, H₂) requerida aumenta. Sin embargo, de acuerdo con la invención, puede ser proporcionada una cantidad óptima de CO mediante el mantenimiento de una relación de CO_2/CO según aumenta la velocidad de suministro de sustrato.

La Fig. 1 es una representación esquemática de un sistema 100, de acuerdo con una realización de la invención. La corriente del sustrato 1 entra en el biorreactor 2 a través de un conducto 3 adecuado. La corriente del sustrato 1 comprende CO y opcionalmente CO₂ y/o H₂ y, en ciertas realizaciones, la corriente de sustrato es una corriente de gas residual de un proceso industrial, tal como la descarbonación del acero. La corriente del sustrato 1 puede ser un flujo constante en el sentido de que se suministra constantemente, pero el contenido de la corriente puede variar con el tiempo. La composición de la corriente del sustrato, en particular la concentración de CO y CO₂ puede ser conocida, o, alternativamente, puede ser determinada por medios de determinación opcionales (no mostrado).

El biorreactor 2 está configurado para realizar la reacción de fermentación deseada para producir productos. De acuerdo con ciertas realizaciones, el biorreactor 2 está configurado para convertir CO en productos que incluyen uno o más ácidos y/o alcoholes. El biorreactor 2 puede comprender más de un depósito, cada depósito configurado para realizar la misma reacción y/o diferentes etapas en un proceso de fermentación particular y/o diferentes reacciones, incluyendo reacciones diferentes para diferentes fermentaciones que pueden incluir una o más etapas comunes.

Los productos producidos en el biorreactor 2, tales como ácidos y/o alcoholes, pueden recuperarse por cualquier procedimiento de recuperación conocido en la técnica.

Los componentes de la corriente de sustrato que no son consumidos en la reacción de fermentación y cualquier derivado de la reacción de fermentación, tal como el CO₂, sale del biorreactor 2 a través de la salida de escape 4.

5 En realizaciones particulares de la invención, los medios de medición 5 están adaptados para determinar la concentración de CO, CO₂ y opcionalmente H₂ en la corriente agotada que sale del biorreactor 2 a través de la salida de escape 4. En realizaciones particulares, la proporción de carbono dirigido a ácido(s) y/o alcohol(es) se puede determinar a partir de la cantidad de CO, CO₂ y H₂ suministrada y la cantidad que sale del biorreactor 2. Por consiguiente, un operador puede hacer opcionalmente ajustes en un cultivo microbiano en el biorreactor 2 y/o en la corriente de sustrato 1 usando los medios de ajuste 6 para mantener el cultivo microbiano, o realizar la transición del cultivo, en un estado deseado de la producción. Los ajustes para mantener o realizar la transición del cultivo incluyen uno o más de: cambio del pH del caldo de fermentación; cambio del potencial redox del caldo de fermentación; cambio de la concentración de CO del caldo de fermentación; cambio de la concentración de H₂ del caldo de fermentación; cambio de la composición de la corriente de sustrato; cambio de presión de la corriente de sustrato; velocidad de agitación del caldo de fermentación; retirada del producto; cambio de la concentración de ácido y/o alcohol del caldo de fermentación; cambio de uno o más nutrientes en el medio nutriente líquido; cambio de la tasa de suministro de uno o más nutrientes.

15 Adicional o alternativamente, el sistema 100 incluye medios de procesamiento opcionales 7 adaptados para determinar la proporción del carbono dirigido hacia productos específicos y medios de ajustes de control 6, de manera que el cultivo pueda mantenerse, o llevarse a transición, en un estado deseado.

En realizaciones particulares, el CO₂, H₂ y CO que entra y/o sale del biorreactor 2 se puede monitorizar de forma continua o en un punto de tiempo discreto y la fijación de carbono ser determinada. Además, los medios de ajuste 6 se pueden configurar para hacer ajustes o ajustes continuos en puntos de tiempo discretos, si es necesario.

20 Cualquier medio para la determinación de la relación $CO_{2\text{ producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se puede utilizar, sin embargo, en realizaciones particulares, uno o más cromatógrafos de gases se utilizan para determinar las concentraciones de CO₂ y CO de la corriente que sale del biorreactor 2 y, opcionalmente, la corriente de sustrato 1. En una realización, el medio para determinar las concentraciones de CO y CO₂ en la corriente que sale del biorreactor 2 es un micro GC Varian CP-4900.

25 Ejemplos

Materiales y métodos (Ejemplo 1 y 2):

Solución A			
NH ₄ Ac	3,083 g	KCl	0,15 g
MgCl ₂ • 6H ₂ O	0,61 g	NaCl	0,12 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,294	Agua destilada	Hasta 1 l
Solución(es) B			
Componente/solución 0,1 M (ac)	Cantidad/ml en 1 L de medio	Componente/solución 0,1 M (ac)	Cantidad/ml en 1 L de medio
FeCl ₃	10 ml	Na ₂ MoO ₄	1 ml
CoCl ₂	5 ml	Na ₂ WO ₄	1 ml
NiCl ₂	5 ml	ZnCl ₂	1 ml
H ₃ BO ₃	1 ml	MnCl ₂	1 ml
Na ₂ SeO ₃	1 ml		
Solución 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	Hasta 1 Litro

ES 2 616 604 T3

Solución(es) D			
Componente/solución 0,1 M (ac)	Cantidad/ml en 1 L de medio	Componente/solución 0,1 M (ac)	Cantidad/ml en 1 L de medio
FeCl ₃	2,5 ml	Na ₂ MoO ₄	0,25 ml
CoCl ₂	1,25 ml	Na ₂ WO ₄	0,25 ml
NiCl ₂	1,2 ml	ZnCl ₂	0,25 ml
H ₃ BO ₃	0,25 ml	MnCl ₂	0,25 ml
Na ₂ SeO ₃	0,25 ml		

Preparación de los medios (Ejemplo 1 y 2)

5 El medio se prepara como sigue: se añadió 85% de H₃PO₄ (20 mmol) a una solución de 1 L de solución A. El pH del medio se ajustó a 5,3 mediante la adición de una solución 5M de NaOH. Las sales metálicas se añadieron entonces opcionalmente de acuerdo con la solución(s) B. La solución del medio se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C, o por esterilización por filtración antes de su uso. Se añadió resazurina como indicador redox y se añadieron 10 ml de solución de vitamina B (solución C).

Preparación de Na₂S_x

10 Un matraz de 500 ml se cargó con Na₂S (93,7 g, 0,39 mol) y 200 ml de H₂O. La solución se agitó hasta que la sal se hubo disuelto y se añadió azufre (25 g, 0,1 mol) en corriente de N₂ constante. Después de 2 horas de agitación a temperatura ambiente, la solución "Na₂S_x" (aproximadamente 4 M con respecto a [Na] y aproximadamente 5M con respecto a [S]), ahora un líquido de color marrón rojizo claro, se transfirió a botellas de suero purgadas con N₂, envueltas en papel de aluminio.

Materiales y métodos Ejemplos 3, 4 y 5:

Solución A			
NH ₄ Ac	3,083 g	CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,294 g
MgCl ₂ • 6H ₂ O	0,61 g	KCl	0,15 g
Agua destilada	Hasta 1 L		
Solución(s) B			
Componente	Mol/L de H ₂ O	Componente	Mol/L de H ₂ O
FeCl ₃	0,1	Na ₂ SeO ₃	0,01
CoCl ₂	0,05	Na ₂ MoO ₄	0,01
NiCl ₂	0,05	ZnCl ₂	0,01
H ₃ BO ₃	0,01	MnCl ₂	0,01
Solución C			
Biotina	20,0 mg	Ácido nicotínico	50,0 mg
Ácido fólico	20,0 mg	D-(*)-pantotenato de calcio	50,0 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
Agua destilada	Hasta 1 Litro		

Preparación de Solución de Cr (II)

Un matraz de 1 L de tres bocas se equipó con una entrada de gas ajustada y salida para permitir funcionar bajo gas inerte y la posterior transferencia del producto deseado en 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 [20 de malla] (18,3 g, 0,28 moles), mercurio (13,55 g, 1 ml, 0,0676 mol) y 500 ml de agua destilada. Después de la inyección de N_2 durante una hora, la mezcla se calentó a aproximadamente 80°C para iniciar la reacción. Después de dos horas de agitación bajo un flujo de N_2 constante, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó continuamente durante otras 48 horas, momento en el cual la mezcla de reacción se había convertido en una solución azul oscuro. La solución se transfirió a botellas de suero purgadas con N_2 y se almacenó en la nevera para su uso futuro.

10 Bacterias: Se utilizó *Clostridium autoethanogenum* que es la depositada en el centro de recursos alemán para materiales biológicos (DSMZ) y asignada con el número de entrada DSMZ 19630.

Muestreo y procedimientos analíticos

15 Fueron tomadas muestras del medio del reactor CSTR a intervalos durante períodos de hasta 20 días. Cada vez que fue tomada la muestra del medio se puso cuidado para asegurarse de que no hubiera gas que entrara o saliera del reactor.

HPLC:

Sistema HPLC Agilent 1100 Series. Fase móvil: ácido sulfúrico 0,0025 N. Flujo y presión: 0,800 ml/min. Columna: Alltech 10A; Catálogo N° 9648, 150 x 6,5 mm, tamaño de partículas de 5 micras. Temperatura de la columna: 60°C Detector: Índice de refracción. Temperatura del detector: 45°C .

20 Método para la preparación de las muestras:

Se cargan 400 μl de muestra y 50 μl de ZnSO_4 0,15 M y 50 μl de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,15 M en un tubo Eppendorf. Los tubos se centrifugaron durante 10 min. a 12.000 rpm, 4°C . 200 μl del sobrenadante se transfieren a un vial de HPLC, y 5 μl se inyectan en el instrumento HPLC.

Análisis del espacio de cabeza:

25 Las mediciones se realizaron en un micro GC CP-4900 de Varian con dos canales instalados. El canal 1 era una columna de 10 m Mol-tamiz funcionando a 70°C , 200 kPa de argón y un tiempo de reflujo de 4,2 s, mientras que el canal 2 era una columna PPQ de 10 m funcionando a 90°C , 150 kPa helio y sin reflujo. La temperatura del inyector para ambos canales fue de 70°C . Los tiempos de ejecución se establecieron en 120 s, pero todos los picos de interés por lo general se eluían antes de los 100 s.

30 Ejemplo 1: Fermentación por lotes en CSTR

1,5 litros de la solución del medio que contenía la solución(es) B fueron aseptícamente y anaeróbicamente transferidos a un recipiente CSTR de 2 L, y continuamente burbujeado con N_2 . Una vez transferido al recipiente de fermentación, el estado de reducción y el pH del medio transferido podían medirse directamente por medio de sondas. El medio se calentó a 37°C y se agitó a 300 rpm. A continuación, el medio se redujo adicionalmente a -130 mV mediante la adición de solución de cloruro de Cr (II) 0,3 M.

35 Se añadió solución de polisulfuro (0,1% v/v, 1,5 ml) a la solución, y se observó un precipitado negro en el medio. También se observó una caída inicial del potencial a -300 mV, que se estabilizó a -150 mV durante varias horas. Se burbujeó N_2 continuamente a través de la solución después de la adición de la solución de polisulfuro.

40 Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla premezclada de 70% de CO , 1% de H_2 , 15% de CO_2 , y 14% de N_2 , que se burbujeó continuamente en el caldo de fermentación durante todo el experimento. Un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* de crecimiento activo se inoculó en el CSTR a un nivel de aproximadamente 7,5% (v/v). Durante este experimento, el pH se mantuvo a aproximadamente 5,5.

Resultados:

45 Una comparación entre la producción de metabolitos y la relación $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ se puede ver en la figura 1. Después de un período de latencia durante el cual el cultivo no consume ninguna cantidad significativa de gas, el consumo de gas y la producción de metabolitos comenzaron después de alrededor de 5 días.

Durante los tres primeros días, la relación $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ se mantuvo entre 0,55 y 0,62, un valor en el que el modelo implica que el etanol se produce en corriente con acetato; un aumento tanto de etanol y acetato se observa a través de análisis por HPLC al mismo tiempo.

50 En el día nueve el $\text{CO}_2_{\text{producido}}/\text{CO}_{\text{consumido}}$ dio un pico a 0,66, un valor proyectado por el modelo que era indicativo de que casi toda la captación de carbono estaba dirigida a la producción de etanol con poca o ninguna producción de

acetato. El análisis por HPLC de este mismo día muestra una producción de etanol continua por el cultivo, pero la nivelación de los niveles de acetato. Una proporción ligeramente superior indicaría un consumo de etilo, un evento observado que se produjo en el periodo durante la noche entre los días 11 y 12 a partir del análisis de HPLC, cuando el análisis del espacio de cabeza del gas no se llevó a cabo.

- 5 En los días 12 y 13, la relación se acercó a 0,6, lo que indicaba una producción de etanol seguida con cierta producción de acetato; de nuevo, una observación que corresponde con las mediciones de HPLC. Desde los días 14 a 16, la proporción se elevó por encima de 0,667, lo que indicaba producción de etanol a partir del consumo de etilo. Los datos de HPLC de estos días muestran la continua acumulación de etanol, pero la fluctuación de los niveles de acetato, con pequeños aumentos y disminuciones. En el día 19, la relación disminuyó drásticamente por debajo de 10 0,5, lo que sugiere consumo de etanol, mostrando el análisis de HPLC para el período una reducción en la concentración de etanol. Después del día 19 el consumo de gas en el reactor fue cercano a cero y el cultivo se presume que era inactivo.

Ejemplo 2: Fermentación por lotes en CSTR

- 15 1,5 litros de la solución de medio sin solución(es) B fueron asépticamente y anaeróticamente transferidos a un recipiente CSTR de 2 L, y se burbujeó continuamente con N₂. Una vez transferido al recipiente de fermentación, el estado de reducción y el pH del medio transferido pudieron medirse directamente por medio de sondas. El medio se calentó a 37°C y se agitó a 300 rpm. A continuación, el medio se redujo adicionalmente a -130 mV mediante la adición de una solución de cloruro de Cr (II) 0,3 M.

- 20 Se añadió solución de polisulfuro (solución 3 M, 1,0 ml) a la solución. Una caída inicial del potencial de -220 mV también se observó, que se estabilizó a -100 mV durante varias horas. Después de 12 horas de burbujeo continuo con N₂, la solución(es) D se añadió a la solución y el ORP se ajustó a aprox. -200 mV mediante la adición de Cr (II).

- 25 Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla premezclada de 70% de CO, 1% de H₂, 15% de CO₂, y 14% de N₂, que se burbujeó continuamente en el caldo de fermentación durante todo el experimento. Un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* con crecimiento activo se inoculó en el CSTR a un nivel de aproximadamente 7,5% (v/v). Durante este experimento, el pH no se controló externamente.

Resultados:

- Una comparación entre la producción de metabolitos y la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se puede ver en la figura 2. Después de un período de latencia durante el cual el cultivo no consumió ninguna cantidad significativa de gas, el consumo de gas y la producción de metabolitos comenzaron alrededor del día 3. Inicialmente, la relación 30 $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se observó que era muy alta, de hecho, más de 1: 1. Los valores calculados más de 1:1 son tratados por el modelo que es igual a 1:1. Una relación de este alto nivel sugiere consumo de acetato y producción de etanol. El análisis por HPLC en este período de tiempo mostró una disminución correspondiente con los niveles de acetato y un aumento en etanol. Entre el día 5 y 9, la relación se situó entre 0,6 y 0,5, lo que indicaba una producción de etanol a co-corriente con la producción de acetato, de acuerdo con el análisis HPLC. Entre los días 8 35 y 11 la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ cayó por debajo de 0,5, lo que indicaba consumo de etanol. En los días 9 y 10 el análisis de HPLC mostró una caída en la concentración de etanol. Después del día 11, la relación se elevó por encima de 0,667, lo que indicaba una producción de etanol a partir del consumo de acetato, de acuerdo con la disminución observada en acetato del análisis HPLC. Este consumo se hizo más pronunciado en los días 13 y 14, con un salto correspondiente en la relación anterior 1:1.

- 40 Durante el período de los días 15 a 18, no se llevó a cabo ningún análisis del espacio de cabeza de gas, aunque el análisis de HPLC mostró una disminución gradual en los niveles de etanol y un ligero aumento de acetato.

- 45 En el día 19, cuando se reanudó el análisis del espacio de cabeza, la relación estaba por encima de 0,667, lo que indicaba una producción de etanol y un consumo de acetato. El análisis por HPLC mostró que los niveles de etanol habían aumentado notablemente durante el período en que no se había efectuado un muestreo, pero los niveles de acetato se mantuvieron más o menos estáticos. Ninguna recolección de más datos se llevó a cabo en el cultivo después del día 20.

Ejemplo 3: Fermentación por lotes en CSTR

- 50 El medio se preparó como sigue: se añadió 85% de H₃PO₄ (45 mmol) a una solución de 1,5 L de la solución A. El pH del medio se ajustó a 5,3 mediante la adición de una solución 5M de NaOH. La solución del medio se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C, o por esterilización por filtración antes de su uso. La resazurina se añadió como indicador redox. La solución del medio se transfirió asépticamente y anaeróticamente a un recipiente CSTR de 1,5 L, y se burbujeó continuamente con N₂. Una vez transferido al recipiente de fermentación, el estado de reducción y el pH del medio transferido pudieron medirse directamente por medio de sondas. El medio se calentó a 37°C y se agitó a 300 rpm.

- 55 Se añadió una solución de sulfuro de sodio (3,75 ml de una solución 0,2 M), seguido de ácido nitriloacético (1,5 ml de una solución 0,1 M), solución B de metal traza (1,5 ml) Na₂WO₄ (1,5 ml de una solución 0,01 M), entonces

Solución C de vitamina B (15 ml). El ORP de la solución se ajustó a aproximadamente -200 mV usando una solución de Cr (II).

Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla de 33% de H₂, 23% de N₂, 31% de CO, 13% de CO₂.

5 Un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* con crecimiento activo se inoculó en el CSTR a un nivel de aproximadamente 10% (v/v). Durante este experimento, el pH se mantuvo a aproximadamente 5,3 y se añadió una solución de Na₂S a una velocidad de aproximadamente 0,16 mmol/día.

10 El suministro de gas y la agitación se aumentó durante el curso de tiempo de la fermentación en respuesta a los cambios en la corriente de gas que salía del biorreactor. De acuerdo con los métodos de la invención, la proporción de carbono dirigido a alcohol se mantuvo en un nivel alto mediante el mantenimiento de un punto de rotura de más de 70% pero inferior al 100%. La captación de CO, H₂ y el punto de rotura se muestran en la figura 4, mientras que el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos se muestran en la figura 5. Al mantener el suministro de sustrato a un nivel para promover la producción de alcohol, no se produce acetato, mientras que el etanol y la biomasa se acumulan rápidamente.

Ejemplo 4: Fermentación por lotes en CSTR

15 El medio se preparó como sigue: se añadió 85% de H₃PO₄ (45 mmol) a una solución de 1,5 L de solución A. El pH del medio se ajustó a 5,3 mediante la adición de una solución 5M de NaOH. La solución del medio se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C, o por esterilización por filtración antes de su uso. La resazurina se añadió como indicador redox. La solución del medio se transfirió asépticamente y anaeróticamente a un recipiente CSTR de 1,5 L, y se burbujeó continuamente con N₂. Una vez transferido al recipiente de fermentación, el estado de reducción y el pH del medio transferido pudieron medirse directamente por medio de sondas. El medio se calentó a 20 37°C y se agitó a 300 rpm.

25 Se añadió una solución de sulfuro de sodio (3,75 ml de una solución 0,2 M), seguido de ácido nitriloacético (1,5 ml de una solución 0,1 M), solución B de metal traza (1,5 ml) Na₂WO₄ (1,5 ml de una solución 0,01 M), entonces Solución C de vitamina B (15 ml). El ORP de la solución se ajustó a aproximadamente -200 mV usando una solución de Cr (II).

30 Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla de 50% de CO y 50% de N₂, que se burbujeó continuamente en el caldo de fermentación durante todo el experimento. Un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* con crecimiento activo se inoculó en el CSTR a un nivel de aproximadamente 10% (v/v). Durante la fermentación, el pH se mantuvo a aproximadamente 5,3 y se añadió una solución de Na₂S a una velocidad de aproximadamente 0,16 mmol/día.

35 El suministro de gas y la agitación se aumentaron durante el curso de tiempo de la fermentación en respuesta a los cambios en la corriente de gas que salía del biorreactor. De acuerdo con los métodos de la invención, la relación de CO₂ producido/CO consumido se mantuvo en aproximadamente 0,667 de tal manera que sustancialmente todo el carbono se dirigía a la producción de alcohol. La captación de CO y la relación de CO₂ producido/CO consumido se muestran en la figura 6, mientras que el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos se muestran en la figura 7. Al mantener el suministro de sustrato a un nivel para promover la producción de alcohol, no se produce acetato, mientras que el etanol y la biomasa se acumulan rápidamente.

Ejemplo 5: Fermentación continua en CSTR

40 Un CSTR de 2 L se estableció en las siguientes condiciones: El medio se preparó como sigue: se añadió 85% de H₃PO₄ (30 mM) a 1,5 L de solución A. El pH del medio se ajustó a 5,3 mediante la adición de NH₄OH. La solución del medio se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C, o por esterilización por filtración antes de su uso. La resazurina se añadió como indicador redox. La solución del medio se transfirió asépticamente y anaeróticamente a un recipiente CSTR de 1,5 L, y se burbujeó continuamente con N₂. Una vez transferido al recipiente de fermentación, el estado de reducción y el pH del medio transferido pudieron medirse directamente por medio de sondas. El medio se calentó a 37°C y se agitó a 300 rpm, a continuación, fueron añadidos una solución B de metal 45 traza incluyendo 0,3 Mol/L de ácido nitriloacético (1,5 ml), después Na₂WO₄ (1,5 ml de una solución 0,01 M), entonces la solución C (15 ml). Antes de la inoculación, el gas se cambió a 2% de H₂, 28% de N₂, 48% de CO, y 22% de CO₂. Un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* con crecimiento activo se inoculó en el CSTR a un nivel de aproximadamente 10% (v/v). Durante este experimento, se añadió una solución (0,2 M) de Na₂S a una velocidad de 50 aproximadamente 0,3 ml/hora.

El cultivo microbiano se dejó crecer en el modo por lotes durante aproximadamente 1 día. El día 1, la fermentación se cambió a un funcionamiento continuo en el que fue proporcionado medio fresco para lograr una tasa de dilución de aproximadamente 1 a 1,8. El suministro del sustrato se incrementó en respuesta a los requerimientos del cultivo microbiano.

55 Los resultados de la fermentación se muestran en la figura 8. La velocidad de suministro de sustrato y la velocidad de agitación se aumentaron o disminuyeron durante el curso del tiempo de la fermentación en respuesta a los

5 cambios en la proporción de CO convertido a CO₂. De acuerdo con la invención, la operación continua sostenible se logra manteniendo una relación CO₂/CO de aproximadamente 0,62 a 0,64. El funcionamiento continuo sostenible dio como resultado una biomasa estable de aproximadamente 3 g/L, una concentración de acetato sustancialmente estable de aproximadamente 5 g/L y una concentración de etanol sustancialmente estable de al menos 10 g/L. La captación de CO específica por el cultivo microbiano se mantuvo a aproximadamente 1,0 mmol/g/min.

Ejemplo 6: Profético

10 La fermentación de un sustrato que comprende CO por un cultivo microbiano carboxidotrófico que comprende medio nutriente líquido, en el que las condiciones (tales como las bien conocidos en la técnica) promueven el rápido crecimiento del cultivo, produjo de forma concomitante acetato. En tales condiciones, la relación de
 15 $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ de manera óptima se mantuvo en aproximadamente 0,5. Sin embargo, en una etapa cuando el operador desea cambiar el cultivo de la producción de acetato a la producción de alcohol, se pueden hacer uno o más ajustes. En realizaciones particulares, el pH del medio nutriente líquido se puede reducir de tal manera que al menos una parte del cultivo microbiano es llevado a transición a un estado donde se produce el alcohol. Cuando se hace la transición deseada, la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ aumenta hacia aproximadamente 0,667. En otra realización, en vez de alterar manualmente el pH, el ajuste puede ser provocado por el cese del control del pH tal que el cultivo microbiano puede auto-regular el pH.

Ejemplo 7: Profético

20 Fermentación de un sustrato que comprende CO por un cultivo microbiano carboxidotrófico en medio nutriente líquido, en el que las condiciones (tales como los bien conocidos en la técnica) promueven la producción de alcohol. En tales condiciones, la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ de manera óptima se mantuvo en aproximadamente 0,667. Sin embargo, si la relación $CO_{2\text{producido}}/CO_{\text{consumido}}$ se desvía de este valor, por ejemplo, al dejar caer a aproximadamente 0,5, uno o más ajustes se pueden hacer para aumentar la relación de nuevo hacia el valor óptimo. Por ejemplo, el componente de hidrógeno de la corriente de gas se puede aumentar de tal manera que la producción de alcohol sea promovida.

25 La invención se ha descrito en este documento con referencia a ciertas realizaciones preferidas, con el fin de permitir al lector practicar la invención sin excesiva experimentación. Los expertos en la técnica apreciarán que la invención es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Es de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. Por otra parte, los títulos, los encabezamientos, o similares se proporcionan para mejorar la comprensión del lector de este documento, y no
 30 deben ser considerados como limitativos del alcance de la presente invención.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es y no debe ser tomada como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esa técnica anterior forma parte del conocimiento general común en el campo de la actividad en cualquier país del mundo.

35 A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, han de interpretarse en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no limitado a".

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la eficiencia de la fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar el sustrato a un cultivo microbiano para producir productos seleccionados del grupo que consiste en ácidos, alcoholes y mezclas de los mismos y CO₂ como un subproducto;
- b) medir la cantidad total de CO consumido y la cantidad de CO₂ producido y calcular la relación de CO₂ producido/CO_{consumido};
- c) ajustar la velocidad de suministro de sustrato para mantener la relación de CO₂ producido/CO_{consumido} dentro de un intervalo predeterminado;
- 10 d) repetir los pasos b y c para mantener la relación de CO₂ producido/CO_{consumido} dentro del intervalo predeterminado.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la velocidad de suministro de sustrato es:
- i) aumentada si la proporción de CO convertido a CO₂ está determinada que está por debajo de un valor o intervalo óptimo; o
- 15 ii) disminuida si la proporción de CO convertido a CO₂ está determinada que está por encima de un valor o intervalo óptimo; o
- iii) mantenida si la proporción de CO convertido a CO₂ está determinada que es sustancialmente un valor o intervalo óptimo.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la velocidad de suministro del sustrato es ajustada automáticamente de tal modo que la proporción de CO convertido en CO₂ se mantiene sustancialmente en un valor o intervalo óptimo.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sustrato que comprende CO comprende menos del 5% de H₂.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto deseado es etanol.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el sustrato que comprende CO comprende al menos de 20% a 100% de CO en volumen.
- 25 7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el cultivo microbiano comprende un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en Clostridia, Moorella, Pyrococcus, Eubacterium, Desulfobacterium, Carboxydotherrmus, Acetogenium, Acetobacterium, Acetoanaerobium, Butyribaceterium y Peptostreptococcus.
- 30 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el microorganismo de Clostridia es Clostridium autoethanogenum.

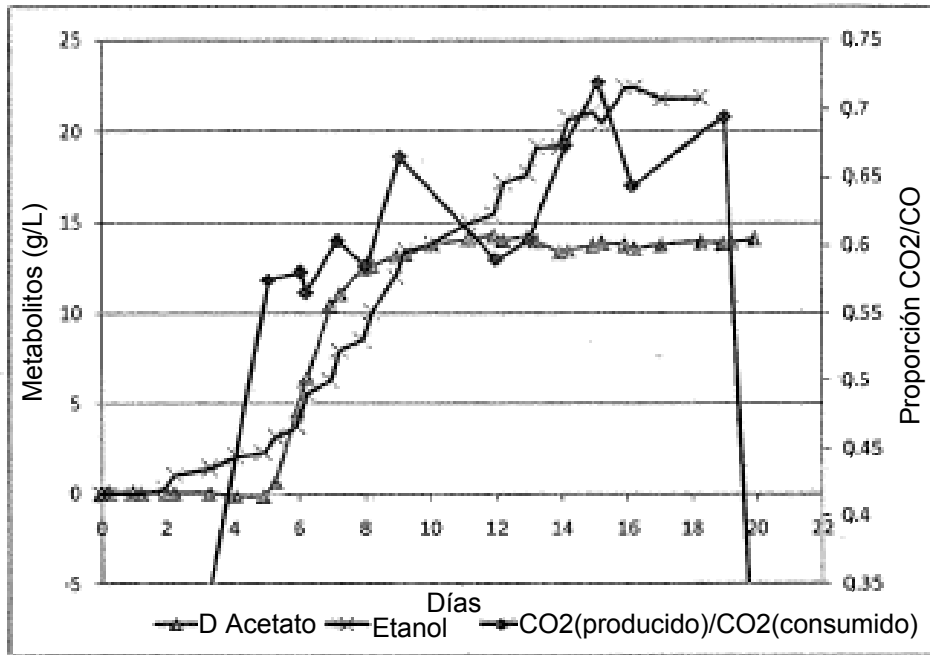


Figura 1

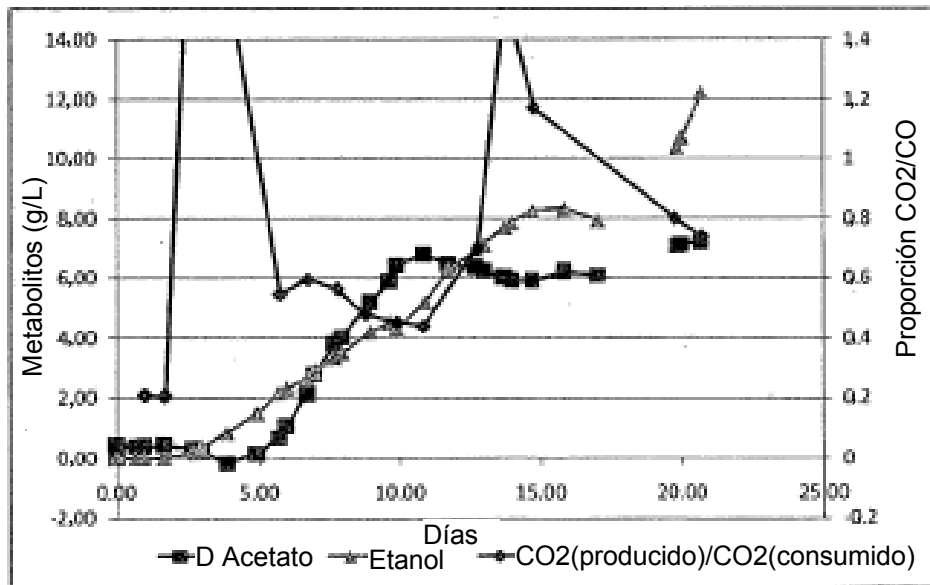


Figura 2

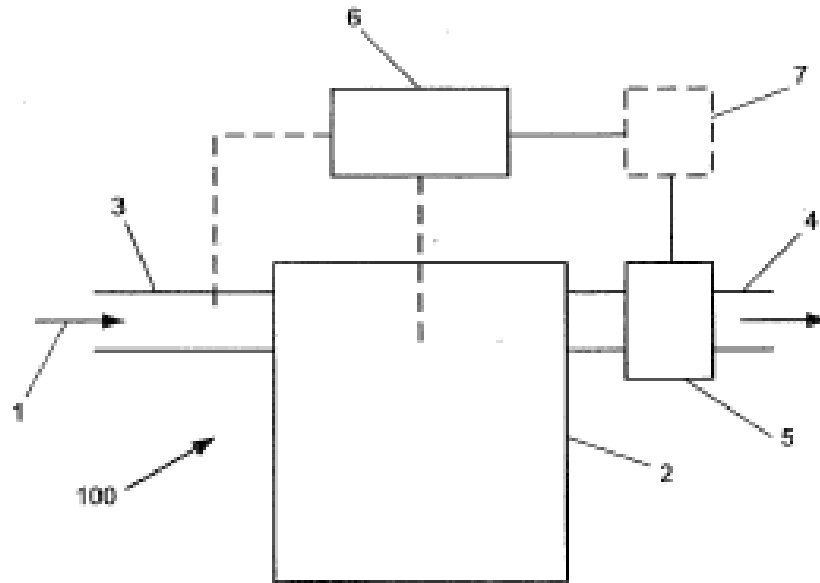


Figura 3

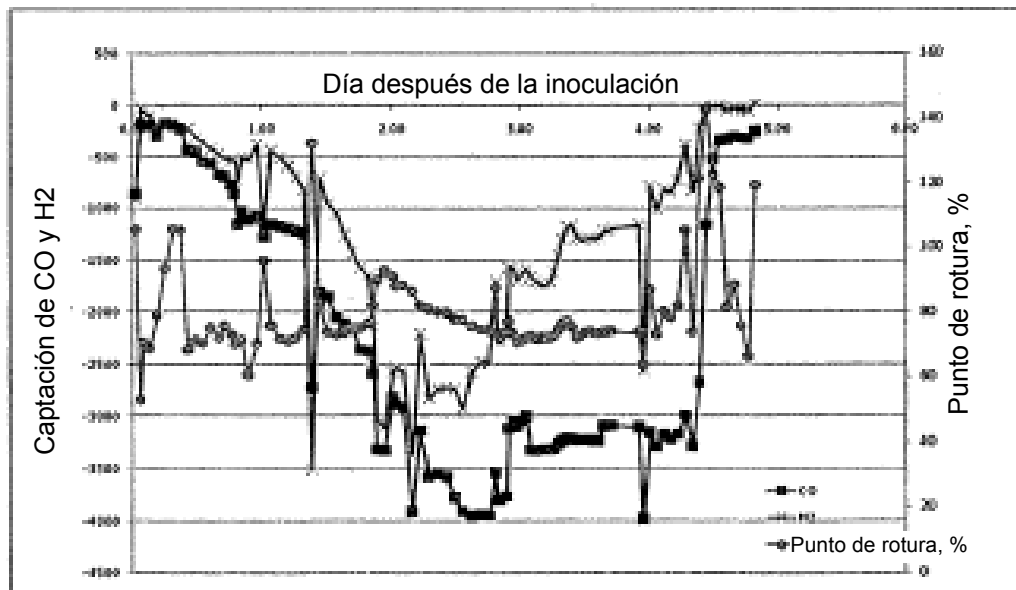


Figura 4

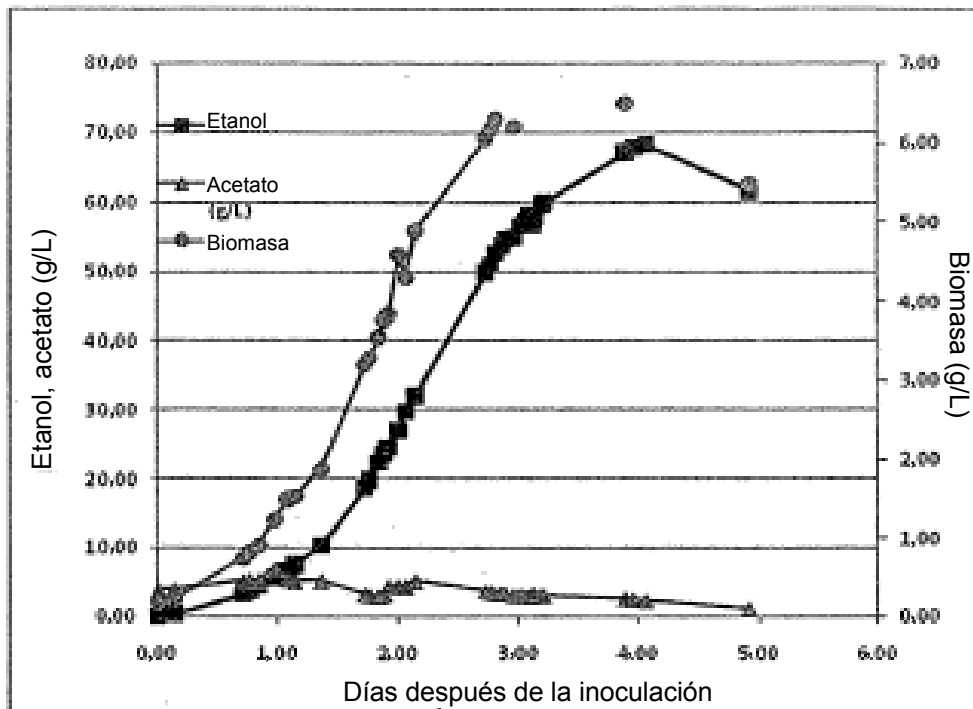


Figura 5

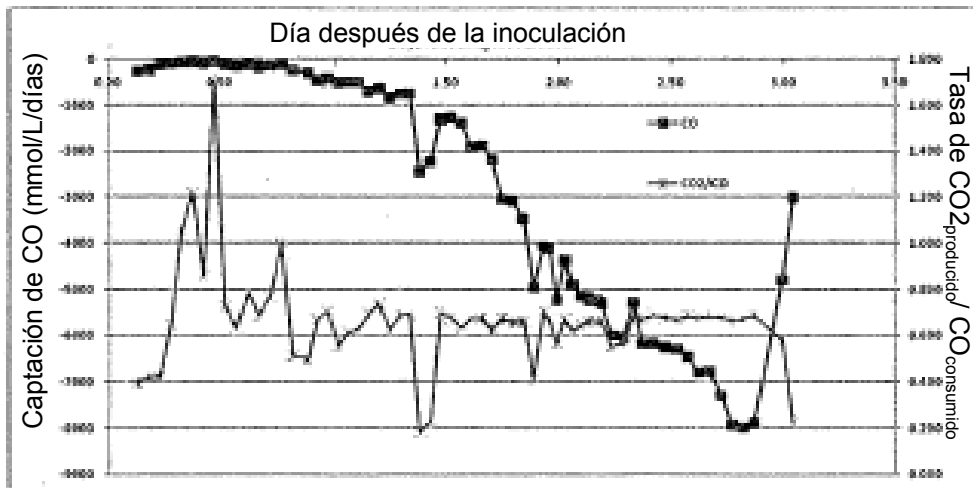


Figura 6

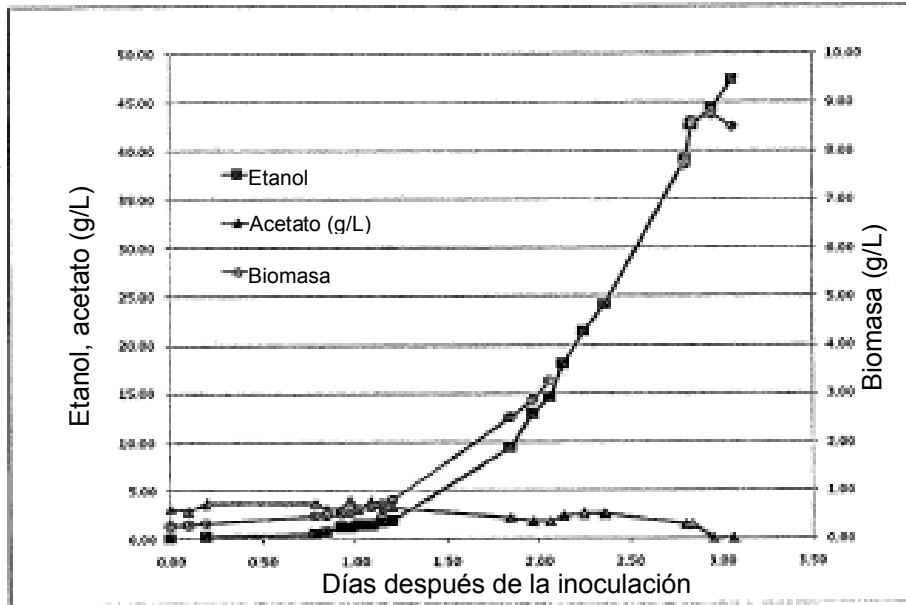


Figura 7

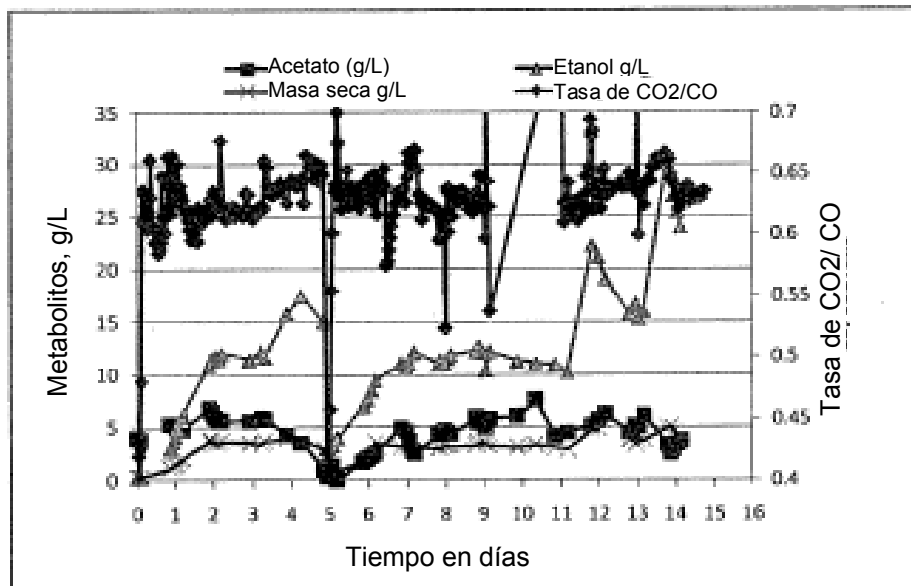


Figura 8