

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 151**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/04** (2006.01)  
**C12P 7/02** (2006.01)  
**C12P 7/06** (2006.01)  
**C12P 7/08** (2006.01)  
**C12P 7/40** (2006.01)  
**C12P 7/54** (2006.01)  
**C12M 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011 E 16164936 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3070170**

54 Título: **Fermentación de CO<sub>2</sub> usando un potencial eléctrico**

30 Prioridad:

**14.01.2010 US 295145 P**

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

**19.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 690 151 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Fermentación de CO<sub>2</sub> usando un potencial eléctrico

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere de forma general a métodos para producir productos, particularmente alcoholes, por fermentación microbiana. En particular, la invención se refiere a métodos para mejorar la eficiencia de la captura de carbono en la fermentación carboxidotrófica.

**Antecedentes de la invención**

10 El etanol se está convirtiendo rápidamente en un combustible de transporte líquido rico en hidrógeno principal en todo el mundo. El consumo mundial de etanol en 2005 se estimó en 12,2 mil millones de galones (46,2 mil millones de litros). También se prevé que el mercado global de la industria de etanol como combustible continúe creciendo rápidamente en el futuro, debido a un interés creciente en el etanol en Europa, Japón, Estados Unidos y varias naciones en vías de desarrollo.

15 Por ejemplo, en los Estados Unidos, el etanol se usa para producir E10, una mezcla al 10% de etanol en gasolina. En las mezclas E10, el componente etanol actúa como un agente oxigenante mejorando la eficiencia de la combustión y reduciendo la producción de contaminantes atmosféricos. En Brasil, el etanol supone aproximadamente el 30% de la demanda de combustible para transporte, tanto como un agente oxigenante mezclado en la gasolina y como combustible puro en sí mismo. Además, en Europa, las preocupaciones medioambientales relacionadas con las consecuencias de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) han sido el estímulo para que la Unión Europea (UE) establezca para las naciones miembros un objetivo obligatorio para el consumo de combustibles para transporte sostenibles, tales como el etanol derivado de la biomasa.

20

La gran mayoría del etanol combustible se produce mediante procedimientos tradicionales de fermentación basados en levaduras que usan hidrocarburos derivados de cultivos, tales como sacarosa extraída de la caña de azúcar o el almidón extraído de cultivos de cereales, como la principal fuente de carbono. Sin embargo, el coste de estas materias primas de hidrocarburos está influido por su valor como alimentación humana o animal, y la plantación de cultivos que producen almidón o sacarosa para la producción de etanol no es sostenible económicamente en todas las geografías. Por lo tanto, hay un interés en el desarrollo de tecnologías para la conversión de recursos de carbono de menor coste y/o más abundantes en etanol combustible.

25

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

30

Se pueden usar procedimientos catalíticos para convertir gases que consisten principalmente en CO y/o CO e hidrógeno (H<sub>2</sub>) en varios combustibles y productos químicos. También se pueden usar microorganismos para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procedimientos biológicos, aunque generalmente son más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procedimientos catalíticos, incluyendo su mayor especificidad, mayores rendimientos, menor coste energético y mayor resistencia al envenenamiento.

35

La capacidad de los microorganismos para crecer en CO como única fuente de carbono se descubrió en primer lugar en 1903. Más tarde se determinó que esto era una propiedad de organismos que usan la vía bioquímica de la acetil-coenzima A (acetil CoA) para el crecimiento autotrófico (también denominada vía de Woods-Ljungdahl y vía de la monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil CoA sintasa (vía CODH/ACS)). Se ha demostrado que un gran número de organismos anaeróbicos, incluyendo organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos, metabolizan CO a varios productos finales, principalmente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metano, n-butanol, acetato y etanol. Aunque usan CO como única fuente de carbono, todos estos organismos producen al menos dos de estos productos finales.

40

Se ha demostrado que las bacterias anaerobias, tales como las del género *Clostridium*, producen etanol a partir de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> a través de la vía bioquímica de la 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 estadounidenses N° 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819 y los documentos WO 98/00558 y 02/08438. También se sabe que la bacteria *Clostridium autoethanogenum* sp. produce etanol a partir de gases (Abrini *et al.*, *Archives of Microbiology* 161, págs.. 345-351 (1994)).

45

Sin embargo, la producción de etanol por microorganismos mediante fermentación de gases se asocia siempre con una coproducción de acetato y/o ácido acético. Como parte del carbono disponible se convierte en acetato/ácido acético en vez de en etanol, la eficiencia de la producción de etanol usando dichos procedimientos de fermentación puede ser menos que la adecuada. Además, a menos que el subproducto de acetato/ácido acético pueda ser utilizado para algún otro objetivo, puede presentar problemas de eliminación de residuos. El acetato/ácido acético es convertido en metano por los microorganismos y, por lo tanto, tiene el potencial de contribuir a las emisiones de GEI.

50

Se sabe que varias enzimas que están asociadas con la capacidad de los microorganismos para usar el monóxido de

55

carbono como su única fuente de carbono y energía necesitan cofactores metálicos para su actividad. Ejemplos de enzimas clave que necesitan enlazarse a un cofactor metálico para su actividad incluyen la monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) y la acetil CoA sintasa (ACS).

5 Los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/058028, WO2009/064200, WO2009/064201 y WO2009/113878 describen procedimientos que producen alcoholes, particularmente etanol, mediante la fermentación anaeróbica de gases que contienen monóxido de carbono. El acetato producido como subproducto del procedimiento de fermentación descrito en el documento WO2007/117157 es convertido en hidrógeno gaseoso y dióxido de carbono gaseoso, cada uno de los cuales o ambos pueden ser utilizados en el procedimiento de fermentación anaeróbica. El documento WO2009/022925 describe el efecto del pH y del ORP en la conversión de los  
10 sustratos que comprenden CO a productos tales como ácidos y alcoholes por fermentación. El documento WO2009/058028 describe el uso de gases residuales industriales para la producción de productos, tales como alcoholes por fermentación. El documento WO2009/064201 describe portadores de CO y el uso de CO en la fermentación. El WO2009/113878 describe la conversión de ácido(s) a alcohol(es) durante la fermentación de un sustrato que comprende CO. Sugimura *et al.*, "Electrochemical Fixation of Carbon Dioxide in Oxoglutaric Acid Using an Enzyme as an Electrocatalyst", *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111, páginas 2.361-2.362, describe la fijación electroquímica del CO<sub>2</sub> en ácido oxoglutarico usando una enzima (isocitrato deshidrogenasa) como electrocatalizador y viológeno de metilo como mediador.

La fermentación de sustratos que comprenden CO y/o CO<sub>2</sub> necesita energía (generalmente denominada "equivalentes de reducción") para fijar el carbono en la masa celular microbiana y/o productos tales como el etanol. Los equivalentes de reducción necesarios para la fijación del carbono en la masa celular y los productos se obtienen generalmente mediante la oxidación del CO y/o H<sub>2</sub>. En ausencia de H<sub>2</sub> todos los equivalentes de reducción se obtienen a partir de la oxidación del CO a CO<sub>2</sub>. Cuando hay hidrógeno disponible, al menos una parte del H<sub>2</sub> se puede usar para producir equivalentes de reducción y se necesita menos CO para ser oxidado a CO<sub>2</sub>. En el caso extremo, cuando hay disponible abundante H<sub>2</sub>, todo el carbono en el CO y/o CO<sub>2</sub> puede fijarse en la masa celular y productos tales como alcoholes y  
20 todos los equivalentes de reducción pueden obtenerse a partir del H<sub>2</sub>. Cuando se produce CO<sub>2</sub> representa una captura de carbono ineficiente y se elimina del sistema de fermentación en lugar de ser fijado. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que vaya al menos de alguna forma hacia la superación de las desventajas anteriores, o al menos proporcionar al usuario una elección útil.

### Sumario de la invención

30 La invención proporciona un método para la fermentación microbiana de un sustrato que comprende dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), en el que el método comprende aplicar un potencial eléctrico a través de un caldo de fermentación que comprende un microorganismo y un medio nutritivo acuoso, donde la fermentación convierte el CO<sub>2</sub> en productos a través de la vía de Wood-Ljungdahl. En modos de realización particulares, el carbono se captura mediante la fijación de CO<sub>2</sub> en la masa celular y/o los productos.

35 En modos de realización particulares, los productos producidos por la fermentación son ácidos y/o alcoholes.

En el método proporcionado anteriormente, el crecimiento microbiano de un microorganismo puede ser aumentado con respecto a la misma fermentación realizada sin aplicar dicho potencial eléctrico.

40 En modos de realización particulares, la tasa de crecimiento microbiano aumenta en al menos 5%. En modos de realización particulares, las tasas de crecimiento microbiano aumentan en al menos 10%. En modos de realización particulares, las tasas de crecimiento microbiano aumentan en al menos 15%. En modos de realización particulares, las tasas de crecimiento microbiano aumentan en al menos 20%.

45 En modos de realización particulares, se aplica un potencial a través de la fermentación por electrolisis. En modos de realización particulares, la electrolisis incluye pasar una corriente directa con un voltaje de hasta 20 V a través de dos electrodos. En modos de realización particulares, se aplica un potencial de al menos 2 V, o al menos 4 V, o al menos 6 V, o al menos 8 V, o al menos 10 V, o al menos 15 V o al menos 20 V. En modos de realización particulares de la invención, el potencial puede ser controlado de forma que se mantenga una corriente esencialmente constante a través del electrolito a aproximadamente 1 mA, o aproximadamente 2 mA, o aproximadamente 3 mA, o aproximadamente 4 mA, o aproximadamente 5 mA, o aproximadamente 6 mA, o aproximadamente 7 mA, o aproximadamente 8 mA, o aproximadamente 9 mA o aproximadamente 10 mA.

50 En modos de realización particulares, el método incluye añadir uno o más mediador(es) de lanzadera de electrones al caldo de fermentación. Alternativamente, la fermentación se puede realizar sin uno o más mediadores de lanzadera de electrones.

55 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de fermentación de un sustrato que comprende CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, en el que al menos una parte del H<sub>2</sub> se usa para producir uno o más equivalentes de reducción. El método según este aspecto de la invención incluye proporcionar uno o más electrones a la fermentación de forma que la cantidad de H<sub>2</sub> usada para producir dichos uno o más equivalentes de reducción disminuya con respecto a la misma fermentación realizada sin aplicar dicho potencial eléctrico.

Los modos de realización de la invención encuentran una aplicación particular en la producción de ácidos y alcoholes. El sustrato puede comprender un gas obtenido como subproducto de un procedimiento industrial. En algunos modos de realización, el procedimiento industrial se elige entre el grupo que consiste en la elaboración de productos de metales ferrosos, elaboración de productos no ferrosos, procedimientos de refinado del petróleo, gasificación de biomasa, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono, producción de amoníaco, producción de metanol y elaboración de coque. En un modo de realización de la invención, el sustrato gaseoso es un gas de síntesis. En un modo de realización, el sustrato gaseoso comprende un gas obtenido de una planta de laminación de acero.

En modos de realización particulares, el sustrato que contiene CO<sub>2</sub> contendrá típicamente una gran proporción de CO, tal como al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, de 40% a 95% de CO en volumen, de 40% a 60% de CO en volumen y de 45% a 55% de CO en volumen. En modos de realización particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO, o aproximadamente 60% de CO en volumen. Los sustratos que tienen concentraciones menores de CO, tales como 6% son apropiados cuando también están presentes el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>.

En varios modos de realización, la fermentación se realiza usando un cultivo de una o más cepas de bacterias carboxidotróficas. En varios modos de realización, la bacteria carboxidotrófica se elige entre *Clostridium Moorella*, *Oxobacter Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*. En un modo de realización, la bacteria carboxidotrófica es *Clostridium autoethanogenum*.

También se describe un biorreactor electroquímico que comprende medios para introducir un sustrato que comprende CO y/o CO<sub>2</sub> y opcionalmente H<sub>2</sub> en un caldo de fermentación y medios para aplicar un potencial a través del caldo de fermentación. Los medios para aplicar un potencial pueden ser controlables, de forma que la corriente deseada se pueda mantener a través del caldo de fermentación.

El biorreactor electroquímico puede estar configurado de forma que el caldo de fermentación pueda mantenerse en una semicelda. La semicelda puede excluir el oxígeno.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de la conversión de CO y/o CO<sub>2</sub> en materia celular y productos mediante la vía de Wood-Ljungdahl.

La figura 2 es una vista de planta de un biorreactor que tiene un medio para aplicar un potencial eléctrico según un modo de realización de la presente invención.

#### Descripción detallada de la invención

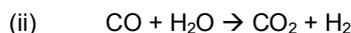
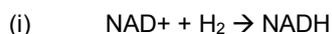
Según la invención, se proporciona un método para la fermentación microbiana de un sustrato que comprende dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), en el que el método comprende aplicar un potencial eléctrico a través de un caldo de fermentación que comprende un microorganismo y un medio nutritivo acuoso, donde la fermentación convierte el CO<sub>2</sub> en productos mediante la vía de Wood-Ljungdahl. En modos de realización particulares, el carbono se captura mediante la fijación del CO<sub>2</sub> en la masa celular y/o los productos. En modos de realización particulares, se usan microorganismos carboxidotrófico en la fermentación. En modos de realización particulares, los productos producidos por la fermentación son ácidos y/o alcoholes. Por ejemplo, la fermentación de un sustrato que contiene carbono por el *Clostridium autoethanogenum* da lugar a productos que incluyen el acetato y el etanol.

Generalmente, los sustratos que comprenden CO y/o CO<sub>2</sub> se convierten en material celular y productos mediante la vía de Wood-Ljungdahl como se representa de forma simplificada en la figura 1.

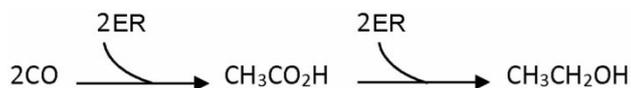
Para el objetivo de la presente invención, los equivalentes de reducción se pueden definir como productos biológicos que reducen la energía, tales como NADH o similar. Los equivalentes de reducción se usan en procedimientos celulares, tales como la fermentación, para fijar el carbono en producto(s) y masa celular, y se usan como poder reductor para producir y reducir los metabolitos formados en la fermentación.

Como puede ser entendido por un experto en la técnica, la fermentación es un procedimiento que permite a las células obtener energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos. En condiciones anaeróbicas, la fermentación permite que se produzca la respiración en ausencia de oxígeno. Hay varios procedimientos de fermentación anaeróbica bien conocidos, incluyendo la fermentación del etanol, la fermentación del ácido láctico y la glicolisis. La fermentación de sustratos que comprenden CO y/o CO<sub>2</sub> mediante la vía de Wood Ljungdahl necesita energía para fijar carbono en la masa celular y/o los productos. Los equivalentes de reducción proporcionan la energía necesaria para estas reacciones. La fermentación de un sustrato que comprende CO puede producir producto(s) que incluyen, pero sin estar limitados a ellos, alcohol(es) y/o ácido(s). Los ejemplos de metabolitos formados mediante dicha fermentación incluyen, pero sin estar limitados a ellos, ácidos tales como el acetato, propionato, butirato, lactato, acrilato; y otros productos tales como etanol, acetona, propanol, butanol y 2,3-butanodiol.

Los equivalentes de reducción se obtienen a partir del H<sub>2</sub> o el CO mediante (i) hidrogenasa o (ii) reacciones de desplazamiento del gas de agua:



5 Los siguientes ejemplos (no limitantes) demuestran la necesidad de equivalentes de reducción (ER) en la conversión de CO a etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH).



10 Como se puede observar en la ecuación anterior, la conversión de CO en etanol necesita dos moléculas con carbono como las proporcionadas por los 2CO mostrados. Se necesitan dos equivalentes de reducción para la fijación del carbono y la reducción del CO a CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H. Dos equivalentes de reducción adicionales son necesarios para la reducción del CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H a CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH. Los requisitos para estos equivalentes de reducción se satisfacen en la siguiente estequiometría.



15 En este caso, los equivalentes de reducción se obtienen del CO por medio de la reacción de desplazamiento del gas de agua. Según un aspecto de la presente invención, al menos una parte de los equivalentes de reducción necesarios para fijar el CO y/o el CO<sub>2</sub> se proporciona eléctricamente. Sin pretender estar vinculado por la teoría, se considera que la aplicación de un potencial a través de una fermentación puede producir la regeneración del poder reductor o equivalentes de reducción, de forma que están disponibles para las reacciones de reducción celulares necesarias para fijar el carbono. En modos de realización particulares, se proporcionan electrones a uno o más microorganismos para reducir la cantidad de CO y/o H<sub>2</sub> necesaria para fijar el carbono en la masa celular y/o los productos. Correspondientemente, a medida que la cantidad de CO necesaria para fijar el carbono en la masa celular y/o los productos disminuye, la cantidad de CO<sub>2</sub> producida como subproducto también disminuye. En modos de realización particulares, se proporcionan electrones por electrolisis.

25 En fermentaciones electroquímicas de hidrocarburos conocidas, los electrones se hacen disponibles generalmente usando mediadores de lanzadera de electrones, tales como el viológeno de metilo, viológeno de bencilo o rojo neutro. Ejemplos de dichas fermentaciones se detallan en el documento de Zeikus *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58: 476-481 y las referencias en dicho documento. En modos de realización particulares de la invención, se proporcionan electrones sin la necesidad de mediadores de lanzadera de electrones. Sin pretender estar vinculado por la teoría, se considera que uno o más componentes de los medios descritos en la sección de Ejemplos de la presente memoria pueden actuar como lanzadera de electrones.

30 También se ha identificado de forma sorprendente que cuando se aplica un potencial a través de una fermentación, el metabolismo del (de los) microorganismo(s) puede cambiar. En modos de realización particulares de la invención, la aplicación de un potencial produce un aumento en el crecimiento microbiano. En modos de realización particulares, la tasa de crecimiento microbiano aumenta en al menos 5%, o al menos 10%, o al menos 15% o al menos 20%. De esta forma, se proporciona un método para aumentar la tasa de crecimiento de un microorganismo. Nótese que puede haber una ligera reducción en la producción del metabolito como resultado de un desplazamiento en el metabolismo de fijación del carbono.

40 Además, se reconoce que durante la fermentación puede haber etapas en las que el crecimiento microbiano es una prioridad, tal como durante la puesta en marcha. Durante esta etapa, se puede aplicar un potencial a través de la fermentación de forma que aumente la tasa de crecimiento. Durante las etapas de fermentación en las que la formación de producto es la prioridad, el potencial puede ser disminuido o eliminado.

45 También se describe un biorreactor electroquímico que comprende medios para proporcionar un sustrato que comprende CO y/o CO<sub>2</sub> a uno o más microorganismos y medios para proporcionar electrones a uno o más microorganismos. Los microorganismos carboxidotróficos son generalmente anaeróbicos y la fermentación de un sustrato que comprende CO y/o CO<sub>2</sub> se proporciona generalmente en forma gaseosa. La fermentación de sustratos que comprenden CO y/o CO<sub>2</sub> se puede realizar en un biorreactor que contiene un caldo de fermentación que comprende uno o más microorganismos y nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento celular y el metabolismo. Según la invención, se pueden proporcionar electrones a los microorganismos aplicando un potencial eléctrico a través del caldo de fermentación. El caldo de fermentación es generalmente un medio nutritivo acuoso que comprende microorganismos y nutrientes metálicos y no metálicos. Dichos medios nutritivos líquidos son electrolitos adecuados en los que los electrones pueden ser proporcionados por uno o más electrodos.

50 En modos de realización particulares, la fermentación se debe mantener anaeróbica, por lo tanto la electrolisis simple del agua no se puede utilizar, ya que el oxígeno generado electrolíticamente puede ser perjudicial para el funcionamiento de la celda microbiana. Sin embargo, se pueden proporcionar electrones a un caldo de fermentación

mediante una semicelda en la que el cátodo puede estar situado en el biorreactor y un ánodo puede estar situado fuera del biorreactor donde la generación de oxígeno no sea perjudicial para la fermentación. En dichas semiceldas, el circuito eléctrico puede ser mantenido proporcionando un puente salino y/o una membrana permeable para soportar el flujo iónico.

- 5 También se reconoce que los métodos de la invención pueden también aumentar la eficiencia energética global de la fermentación de un sustrato que comprende CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Estos sustratos se proporcionan generalmente en forma gaseosa y hay un coste energético significativo asociado con la transferencia de dichos compuestos en disolución para su conversión en los productos. Sin embargo, la energía necesaria para transferir la misma cantidad de equivalentes de reducción, en forma de electrones, en disolución es esencialmente menor.

## 10 *Definiciones*

A menos que se defina de otro modo, los siguientes términos tal como se utilizan a lo largo de la presente memoria se definen como se indica a continuación.

- 15 La expresión “sustrato que comprende monóxido de carbono” y expresiones similares deben entenderse como que incluyen cualquier sustrato en el que el monóxido de carbono esté disponible para una o más cepas de bacterias para su crecimiento y/o fermentación, por ejemplo.

“Sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono” incluye cualquier gas que contiene monóxido de carbono. El sustrato gaseoso contendrá generalmente una proporción significativa de CO, preferiblemente al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 100% de CO en volumen.

- 20 En el contexto de los productos de fermentación, el término “ácido” como se usa en la presente memoria incluye tanto los ácidos carboxílicos como los aniones carboxilato asociados, tal como la mezcla de ácido acético libre y acetato presente en un caldo de fermentación como se describe en la presente memoria. La relación entre el ácido molecular y el carboxilato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema. El término “acetato” incluye tanto la sal de acetato sola como una mezcla de ácido acético molecular o libre y sal de acetato, tal como la mezcla de sal de acetato y ácido acético libre presente en un caldo de fermentación como puede ser descrito en la presente memoria. La  
25 relación entre el ácido acético molecular y el acetato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema.

- “Mediadores de lanzadera de electrones” o “mediador(es) redox” y similares, como se usa en la presente memoria pretende hacer referencia a una lanzadera de electrones que actúa como un dador de electrones y/o aceptor de electrones reversible. Los mediadores incluyen los colorantes viológenos (tales como el viológeno de metilo), antraquinona y otros colorantes de quinona, colorantes de trifenilmetano, ftalocianinas, colorantes de metina,  
30 colorantes de pirrol, colorantes de porfirina, pteridinas, pteridonas, flavinas y complejos metálicos de los grupos secundarios VI, VII y VIII.

- El término “biorreactor” incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o sistemas de tuberías, que incluye el reactor de tanque con agitación continua (CSTR), reactor de células inmovilizadas (ICR), reactor de lecho percolador (TBR), reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR), columna de burbujas,  
35 fermentador de levantamiento por aire, reactor de membrana tal como el biorreactor de membrana de fibras huecas (HFMBR), mezclador estático, y otros recipientes u otros dispositivos adecuados para el contacto gas/líquido.

- A menos que el contexto requiera otros significado, las frases “fermentación”, “procedimiento de fermentación” o “reacción de fermentación” y similares, como se usan en la presente memoria, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del procedimiento. Como se describirá adicionalmente en la presente memoria, en algunos modos de realización el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Por lo tanto, se debe entender que la adición de metales o composiciones a la  
40 reacción de fermentación incluye la adición a cada uno de estos reactores o a ambos.

- Aunque la siguiente descripción se centra en la producción de etanol y/o acetato usando CO como sustrato principal, se debe entender que la invención puede ser aplicable a la producción de alcoholes y/o ácidos alternativos y el uso de sustratos alternativos, como conocerán bien los expertos en la técnica relacionada con la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar sustratos gaseosos que contengan 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 utilizados para producir hidrógeno. A modo de ejemplo, estos productos pueden ser producidos por fermentación usando microbios del género *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*,  
50 *Butyribacterium*, *Oxobater*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina* y *Desulfotomaculum*.

## *Fermentación*

- Algunos modos de realización de la invención están adaptados a la utilización de corrientes de gas producidas por uno o más procedimientos industriales. Dichos procedimientos incluyen procedimientos de elaboración de acero, particularmente procedimientos que producen una corriente de gas que tiene un contenido elevado de CO o un  
55 contenido de CO por encima de un nivel predeterminado (p. ej., 5%). Según dichos modos de realización, preferiblemente se usan bacterias acetogénicas para producir ácidos y/o alcoholes, particularmente etanol o butanol,

en uno o más biorreactores. Los expertos en la técnica serán conscientes mediante la consideración de la descripción inmediata de que la invención puede ser aplicada a varias industrias o corrientes gaseosas residuales, incluyendo las de los vehículos con un motor de combustión interna. Además, los expertos en la técnica serán conscientes mediante la consideración de la descripción inmediata de que la invención puede ser aplicada a otras reacciones de fermentación, incluyendo las que usan los mismos o diferentes microorganismos. Se pretende por lo tanto que el alcance de la invención no se limite a los modos de realización y/o aplicaciones particulares descritos, sino que debe ser entendida mejor en un sentido más amplio; por ejemplo, la fuente de la corriente de gas no es limitante, aparte de por que al menos uno de sus componentes sea utilizable para alimentar una reacción de fermentación. La invención tiene aplicabilidad particular para mejorar la captura de carbono global y/o la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos que comprenden CO. Los procedimientos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos que comprenden CO son conocidos. Ejemplos ilustrativos incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/064200, US 6.340.581, US 6.136.577, US 5.593.886, US 5.807.722 y US 5.821.111.

Se conocen varias bacterias anaeróbicas que son capaces de realizar la fermentación del CO a alcoholes, incluyendo el n-butanol y el etanol, y ácido acético, y son adecuadas para usarlas en el procedimiento de la presente invención. Los ejemplos de dichas bacterias que son adecuadas para usarlas en la invención incluyen las del género *Clostridium*, tal como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo las descritas en los documentos WO 00/68407, EP 117309 las patentes estadounidenses N° 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819 y los documentos WO 98/00558 y WO 02/08438; *Clostridium carboxydvorans* (Liou *et al.*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33, págs.. 2.085-2.091); *Clostridium ragsdalei* (WO 2008/028055) y *Clostridium autoethanogenum* (Abrini *et al.*, *Archives of Microbiology* 161, págs. 345-351). Otras bacterias adecuadas incluyen las del género *Moorella*, incluyendo *Moorella sp* HUC22-1 (Sakai *et al.*, *Biotechnology Letters* 29, págs.. 1.607-1.612) y las del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G. *et al.* (1991), *Systematic and Applied Microbiology* 14, 254-260). Ejemplos adicionales incluyen *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Ruminococcus productus*, *Acetobacterium woodii*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Oxobacter pfennigii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans* y *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Simpa *et al.* *Critical Reviews in Biotechnology*, 2006 Vol. 26, págs. 41-65). Además, se debe entender que otras bacterias anaeróbicas acetogénicas pueden ser aplicables a la presente invención como puede ser entendido por un experto en la técnica. También se entenderá que la invención puede ser aplicada a un cultivo mixto de dos o más bacterias.

Un microorganismo ilustrativo adecuado para usarlo en la presente invención es el *Clostridium autoethanogenum*. En un modo de realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificativas de la cepa depositada en el Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ) con el número identificativo de depósito 19630. En otro modo de realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificativas del número de depósito DSMZ 10061 del DSMZ.

El cultivo de las bacterias usadas en los métodos de la invención se puede realizar usando varios procedimientos conocidos en la técnica del cultivo y fermentación de sustratos usando bacterias anaeróbicas. En la sección de Ejemplos siguiente se proporcionan técnicas ilustrativas. A modo de ejemplo adicional, se pueden usar los procedimientos descritos de forma general en los siguientes artículos que utilizan 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; y (vi) J. L. Vega, *et al.* (1990) Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. *Resources, Conservation and Recycling*, 3, 149-160.

La fermentación se puede realizar en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de tanque con agitación continua (CSTR), un reactor de células inmovilizadas, un reactor por levantamiento de aire, un reactor de columna de burbujas (BCR), un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibras huecas (HFMBR) o un reactor de lecho percolador (TBR). Además, en algunos modos de realización de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que se cultivan los microorganismos y un segundo reactor de fermentación en el que se alimenta el caldo de fermentación del reactor de crecimiento y en el que se produce la mayor parte del producto de fermentación (p. ej., etanol y acetato).

Según varios modos de realización de la invención, la fuente de carbono de la reacción de fermentación es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como subproducto de un procedimiento industrial, o de otra fuente tal como los gases de escape de los automóviles. En algunos modos de realización, el procedimiento industrial se elige entre el grupo que consiste en la elaboración de productos de metales ferrosos, tal como una planta de laminación de acero, elaboración de productos no ferrosos, procedimientos de refinado de petróleo, gasificación de carbono, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono, producción de amoníaco, producción de metanol y elaboración de coque. En estos modos de realización, el sustrato que contiene CO puede ser capturado del procedimiento industrial antes de ser emitido a la atmósfera, usando

cualquier método adecuado. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO, también puede ser adecuado tratarlo para eliminar cualquier impureza no deseada, tal como partículas de polvo, antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede ser filtrado o lavado usando métodos conocidos.

5 Alternativamente, el sustrato que contiene CO puede ser obtenido de la gasificación de biomasa. El procedimiento de gasificación implica la combustión parcial de la biomasa con un suministro restringido de aire o de oxígeno. El gas resultante comprende de forma general principalmente CO y H<sub>2</sub>, con volúmenes mínimos de CO<sub>2</sub>, metano, etileno y etano. Por ejemplo, los subproductos de biomasa obtenidos durante la extracción y procesamiento de alimentos tales como azúcar de caña o almidón de maíz o cereales, o residuos de biomasa no alimentarios de la industria forestal pueden ser gasificados para producir un gas que contiene CO adecuado para usarlo en la presente invención.

10 El sustrato que contiene CO contendrá generalmente una gran proporción de CO, tal como al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% en volumen, de 40% a 95% de CO en volumen, de 60% a 90% de CO en volumen y de 70% a 90% de CO en volumen. En modos de realización particulares, el sustrato comprende 25%, o 30% o 35%, o 40%, o 45%, o 50% de CO en volumen. Los sustratos que tienen menores concentraciones de CO, tal como 6%, pueden ser también adecuados, particularmente cuando hay presente también H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

15 Aunque no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno en absoluto, la presencia de H<sub>2</sub> no sería perjudicial para la formación del producto según los métodos de la invención. En modos de realización particulares, la presencia de hidrógeno da lugar a una eficiencia global mejorada de la producción de alcohol. Por ejemplo, en modos de realización particulares, el sustrato puede comprender una relación aproximada de 2:1 o 1:1 o 1:2 de H<sub>2</sub>:CO. En otros modos de realización, la corriente de sustrato comprende bajas concentraciones de H<sub>2</sub>, por ejemplo menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2% o menos de 1% o está esencialmente libre de hidrógeno. El sustrato también puede contener por ejemplo algo de CO<sub>2</sub>, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO<sub>2</sub> en volumen, o 1% a aproximadamente 30% de CO<sub>2</sub> en volumen. En modos de realización particulares, la corriente de sustrato comprende CO<sub>2</sub> y nada o una mínima cantidad de CO.

25 Generalmente, el monóxido de carbono se añadirá a la reacción de fermentación en estado gaseoso. Sin embargo, los métodos de la invención no están limitados a la adición del sustrato en este estado. Por ejemplo, el monóxido de carbono se puede proporcionar en un líquido. Por ejemplo, se puede saturar un líquido con un gas que contiene monóxido de carbono y añadir dicho líquido al biorreactor. Esto se puede realizar usando metodología convencional. A modo de ejemplo, con este objetivo se podría usar un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak *et. al.* Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 101, N° 3 / Octubre de 2002).

30 Se apreciará que para que se produzca el crecimiento de las bacterias y la fermentación del CO a alcohol, además del gas sustrato que contiene CO, será necesario alimentar un medio nutritivo líquido adecuado en el biorreactor. Un medio nutritivo contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo utilizado. Los medios anaeróbicos adecuados para la fermentación del etanol usando CO como única fuente de carbono son conocidos en la técnica. Por ejemplo, medios adecuados se describen en las patentes estadounidenses N° 5.173.429 y 5.593.886 y en los documentos WO02/08438, WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/058028, WO2009/064200, WO2009/064201 y WO2009/113878 mencionados anteriormente. También se describe un nuevo medio que tiene eficacia aumentada en el sostenimiento del crecimiento de los microorganismos y/o la producción de alcohol en el procedimiento de fermentación. Estos medios se describirán con más detalle en la parte siguiente de la presente memoria.

35 Sería deseable que la fermentación se realizara en condiciones adecuadas para que se produzca la fermentación deseada (p. ej., CO a etanol). Las condiciones de reacción que deberían considerarse incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial redox del medio, tasa de agitación (si se usa un reactor de tanque con agitación continua), nivel de inóculo, concentraciones máximas del sustrato gaseoso para asegurar que el CO en la fase líquida no se haga limitante y concentraciones máximas del producto para evitar la inhibición del producto. Las condiciones adecuadas se describen en los documentos WO02/08438, WO07/117157, WO08/115080 y WO2009/022925.

40 Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular utilizado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se realice a una presión superior a la presión atmosférica. La operación a presiones aumentadas permite un aumento significativo de la tasa de transferencia de CO de la fase gaseosa a la fase líquida con lo que 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) puede ser reducido cuando los biorreactores se mantienen a una presión elevada en lugar de a presión atmosférica.

55 Además, como una tasa de conversión de CO a etanol dada es función en parte del tiempo de retención del sustrato, y a su vez la obtención de un tiempo de retención deseado dicta el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir de forma importante el volumen requerido del biorreactor y, consiguientemente, el coste económico del equipo de fermentación. Según los ejemplos dados en la patente estadounidense N° 5.593.886, el volumen del reactor puede ser reducido en proporción lineal con el aumento de la presión de operación en el reactor,

es decir los biorreactores que operan a 10 atmósferas de presión necesitan tener solo una décima parte del volumen de los que operan a 1 atmósfera de presión.

5 Los beneficios de realizar la fermentación del gas a etanol a presiones elevadas también han sido descritos en otras partes. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones de 30 psig (2,1 atm) y 75 psig (5,1 atm), dando productividades en etanol de 150 g/L/día y 369 g/L/día respectivamente. Sin embargo, se encontraron ejemplos de fermentaciones realizadas usando medios y composiciones de gas de entrada similares realizadas a presión atmosférica que produjeron entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

10 También es adecuado que la tasa de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no sea limitante. Esto es debido a que una consecuencia de las condiciones de CO limitado puede ser que el etanol producido sea consumido por el cultivo.

#### *Recuperación del producto*

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

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

20 Los procedimientos de fermentación extractiva implican el uso de un disolvente miscible con el agua que presente bajo riesgo de toxicidad para el organismo de la fermentación, para recuperar el etanol a partir del caldo de fermentación diluido. Por ejemplo, el alcohol oleílico es un disolvente que se puede utilizar en este tipo de procedimiento de extracción. El alcohol oleílico se introduce continuamente en un fermentador, con lo cual este disolvente asciende 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 a continuación fácilmente del alcohol oleílico y se vuelven a introducir en el fermentador mientras que el disolvente cargado de etanol se alimenta en una unidad de vaporización instantánea. La mayoría del etanol se vaporiza y se condensa mientras que el alcohol oleílico no es volátil y se recupera para ser reutilizado en la fermentación.

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

35 Por ejemplo, se puede usar un sistema de adsorción que implica un filtro de carbón activado. En este caso, se prefiere que las células microbianas se retiren en primer lugar del caldo de fermentación usando una unidad de separación adecuada. Numerosos métodos de generación de un caldo de fermentación sin células basados en la filtración para la recuperación del producto son conocidos en la técnica. El filtrado que contiene etanol –y acetato– sin células se pasa a continuación a través de una columna que contiene carbón activado para adsorber el acetato. El acetato en forma ácida (ácido acético) más que la forma de sal (acetato) es adsorbido más fácilmente por el carbón activado. Por lo tanto, se prefiere que el pH del caldo de fermentación sea reducido a menos de aproximadamente 3 antes de pasarlo a través de la columna de carbón activado, para convertir la mayor parte del acetato en la forma de ácido acético.

40 El ácido acético adsorbido en el carbón activado puede recuperarse por elución usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar etanol para eluir el acetato enlazado. En algunos modos de realización, el mismo etanol producido por el procedimiento de fermentación se puede usar para eluir el acetato. Como el punto de ebullición del etanol es 78,8°C y el del ácido acético es 107°C, el etanol y el acetato se pueden separar fácilmente usando un método basado en la volatilidad tal como la destilación.

45 Otros métodos para recuperar el acetato del caldo de fermentación también son conocidos en la técnica y pueden ser utilizados en los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, las patentes estadounidenses N° 6.368.819 y 6.753.170 describen un sistema de disolvente y codisolvente que puede ser utilizado para la extracción del ácido acético de los caldos de fermentación. Como en el ejemplo del sistema basado en el alcohol oleílico descrito para la fermentación extractiva del etanol, los sistemas descritos en las patentes estadounidenses N° 6.368.819 y 6.753.170 describen un sistema de disolvente/codisolvente inmiscible con el agua que se puede mezclar con el caldo de fermentación bien en presencia o bien en ausencia de los microorganismos fermentados con el fin de extraer el producto de ácido acético. El sistema disolvente/codisolvente que contiene el producto de ácido acético se separa a continuación del caldo por destilación. A continuación, se puede usar una segunda etapa de destilación para purificar el ácido acético del sistema de disolvente/codisolvente.

55 Los productos de la reacción de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato) pueden ser recuperados del caldo de fermentación retirando de forma continua 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 simultánea o secuencialmente. En el caso del etanol puede ser recuperado convenientemente por destilación y el acetato puede

ser recuperado por adsorción sobre carbón activado, usando los métodos descritos anteriormente. Las células microbianas separadas se vuelven a introducir preferentemente en el biorreactor de fermentación. El filtrado sin células que queda después de que se han retirado el etanol y el acetato también se vuelve a introducir preferiblemente en el biorreactor de fermentación. Se pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitaminas B) al filtrado sin células para reponer el medio nutritivo antes de que se vuelva a introducir en el biorreactor. Además, si el pH del medio se ajustó como se ha descrito anteriormente para aumentar la adsorción del ácido acético sobre el carbón activado, el pH debería ser re-ajustado a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación antes de ser devuelto al biorreactor.

#### *Fermentación electroquímica*

En el método de la presente invención, la captura del carbono puede ser aumentada con respecto a la misma fermentación realizada sin aplicar dicho potencial eléctrico. Se puede aplicar un potencial eléctrico a través de una fermentación por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un medio conocido para aplicar un potencial eléctrico es una célula electroquímica. En particular, una célula electroquímica adecuada para usarla con los métodos de la invención es una celda electrolítica. Según la invención, la fermentación se realiza generalmente con un caldo de fermentación que comprende uno o más microorganismos y un medio nutritivo acuoso que comprende los nutrientes esenciales, incluyendo iones metálicos. Por lo tanto, el medio nutritivo líquido proporciona un electrolito ideal para la electrolisis. Consecuentemente, se puede aplicar un potencial proporcionando electrodos conectados a un circuito eléctrico.

En modos de realización particulares de la invención, el microorganismo es anaeróbico y debe ser mantenido esencialmente sin oxígeno. En la electrolisis, donde ambos electrodos se extienden en un electrolito, se formará oxígeno en el ánodo por disociación del agua. Esto sería perjudicial para el cultivo microbiano. Por lo tanto, en modos de realización particulares, el método incluye aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación mediante una semicelda en la que el ánodo está separado del caldo de fermentación mediante una membrana permeable a los iones o alternativamente un puente salino. En dichos modos de realización, el oxígeno puede ser descargado sin perjuicio para el cultivo microbiano.

Según la invención, el potencial eléctrico aplicado a la fermentación aumenta la eficiencia de la fijación del carbono. En modos de realización particulares de la invención, una bacteria carboxidotrófica fijará al menos una parte de un sustrato que comprende CO<sub>2</sub> en la masa celular y/o en productos tales como el etanol. La energía necesaria para fijar el carbono se denomina generalmente como "equivalentes de reducción" y se puede obtener mediante la oxidación de varias entidades reducidas. Las bacterias carboxidotróficas, tales como la *Clostridium autoethanogenum*, originan generalmente equivalentes de reducción mediante la oxidación del CO y/o H<sub>2</sub>. Sin embargo, según la invención, la eficiencia de la fijación del carbono se mejora mediante la aplicación de un potencial a través de una fermentación. Según la invención, el carbono se fija como masa celular y productos tales como el etanol con un menor requerimiento para el CO y/o H<sub>2</sub> como equivalentes de reducción. Por lo tanto, la aplicación de un potencial a través de una fermentación carboxidotrófica disminuye la cantidad de CO<sub>2</sub> producida por cantidad de carbono fijado como masa celular y/o productos.

Generalmente, cuando se aplica un potencial a través de una fermentación, se reducen uno o más mediadores de lanzadera de electrones, tales como el viológeno de bencilo o viológeno de metilo presentes en el caldo de fermentación. Estos mediadores, a su vez, ayudan a la reducción en el mecanismo de reducción de las células microbianas, tal como el par Ferredoxina<sub>ox/red</sub> o los pares NAD(P)H/NAD(P). Por lo tanto, según modos de realización particulares de la invención, se proporcionan uno o más mediadores de lanzadera de electrones en el caldo de fermentación. Sin embargo, en modos de realización particulares, el método se realiza sin la necesidad de mediadores de lanzadera de electrones.

También se ha reconocido que la aplicación de un potencial también puede alterar como fijan el carbono el(los) microorganismo(s). En el ejemplo proporcionado en la presente memoria, la aplicación de un potencial a través de una fermentación aumenta la proporción de carbono dirigido hacia la masa celular y, por lo tanto, aumenta el crecimiento microbiano. En modos de realización particulares, el crecimiento microbiano se aumenta al menos 5%, o al menos 10%, o al menos 15% o al menos 20%.

Los expertos en la técnica apreciarán como determinar el potencial necesario para mejorar la eficiencia de la fijación del carbono y/o mejorar el crecimiento microbiano. Sin embargo, a modo de ejemplo, una corriente directa con un voltaje de hasta 20 V puede ser aplicada a través de los electrodos. En modos de realización particulares, se aplica un potencial de al menos 2 V, o al menos 4 V, o al menos 6 V, o al menos 8 V, o al menos 10 V, o al menos 15 V o al menos 20 V. En modos de realización particulares de la invención, el potencial puede ser controlado de forma que se mantenga una corriente esencialmente constante a través del electrolito a aproximadamente 1 mA, o aproximadamente 2 mA, o aproximadamente 3 mA, o aproximadamente 4 mA, o aproximadamente 5 mA, o aproximadamente 6 mA, o aproximadamente 7 mA, o aproximadamente 8 mA, o aproximadamente 9 mA o aproximadamente 10 mA. De nuevo, los expertos en la técnica sabrán como determinar una corriente óptima que puede cambiar a lo largo del tiempo o puede ser diferente para diferentes microorganismos.

También se describe en la presente memoria un biorreactor electroquímico que comprende medios para introducir un

sustrato que comprende CO y/o CO<sub>2</sub> y opcionalmente H<sub>2</sub> en un caldo de fermentación para aplicar un potencial a través del caldo de fermentación. El medio para aplicar un potencial puede ser controlable de forma que la corriente deseada pueda ser mantenida a través del caldo de fermentación.

- 5 La figura 2 muestra un biorreactor electroquímico. El biorreactor 1 incluye medios para suministrar un sustrato gaseoso (2) y medios para aplicar un potencial a través de una fermentación. La fermentación puede ser anaeróbica, por lo tanto el biorreactor electroquímico comprende dos electrodos 3 separados por un separador 4 permeable a los iones. El separador permeable a los iones puede ser una membrana porosa o un material cerámico u otro material adecuado conocido en la técnica. Durante el uso, una parte del biorreactor 5 puede estar rellena con un caldo de fermentación que comprende uno o más microorganismos y un medio nutritivo líquido. Durante el uso, otra parte del biorreactor 6 puede estar rellena con una disolución salina conductora. Los electrodos 3 están configurados de forma que, durante el uso, se puedan extender en el caldo de fermentación y en la disolución salina conductora. El biorreactor también comprende un circuito eléctrico y medios para controlar un potencial (7) a través de los electrodos.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

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

15

### Preparación de la disolución de Cr (II)

- Un matraz de tres bocas de 1 L se ajustó con entrada y salida estancas a los gases para poder trabajar en una atmósfera de gas inerte y transferir posteriormente el producto deseado a un recipiente de almacenamiento adecuado. El matraz se cargó con CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (40 g, 0,15 moles), gránulos de zinc [malla 20] (18,3 g, 0,28 moles), mercurio (13,55 g, 1 mL, 0,0676 moles) y 500 mL de agua destilada. Después de purgar con N<sub>2</sub> durante una hora, la mezcla se calentó a aproximadamente 80°C para iniciar la reacción. Después de dos horas de agitación con un flujo constante de N<sub>2</sub>, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó continuamente durante otras 48 horas, tiempo en el que la mezcla de reacción se volvió una disolución azul oscuro. La disolución se transfirió en botellas de suero purgadas con N<sub>2</sub> y se almacenó en el frigorífico para su uso futuro.

- 25 **Bacterias:** la *Clostridium autoethanogenum* usada es la depositada en el Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ) y asignada con el número de acceso DSMZ 19630.

**Muestreo y procedimientos analíticos**

Se tomaron muestras del medio del reactor CSTR a intervalos durante periodos hasta 20 días. Cada vez que se muestreó el medio se tuvo cuidado para asegurarse de que no se dejaba pasar gas dentro del reactor ni escapar de él.

5 **HPLC:**

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

*Método de preparación de muestras:*

- 10 Se cargaron 400 µL de muestra y 50 µL de ZnSO<sub>4</sub> 0,15M y 50 µL de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,15M en un tubo Eppendorf. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm, 4°C. 200 µL del sobrenadante se transfirieron en un vial de HPLC y 5 µL se inyectaron en el instrumento de HPLC.

*Análisis de la cámara de aire:*

- 15 Las medidas se realizaron con un microGC Varian CP-4900 con dos canales instalados. El canal 1 era una columna de tamiz molecular de 10 m que funcionaba a 70°C, 200 kPa de argón un tiempo de retroflujo de 4,2 s, mientras que el canal 2 era una columna PPQ de 10 m funcionando a 90°C, 150 kPa de helio y sin retroflujo. La temperatura del inyector para ambos canales era de 70°C. Los tiempos de ejecución se ajustaron a 120 s, pero todos los picos de interés eluían generalmente antes de 100 s.

**Ejemplo 1: fermentación en lotes en reactores CSTR**

- 20 Dos reactores CSTR de 2 L (A) y (B) se ajustaron con las siguientes condiciones. Se prepararon los medios como se indica: se añadió H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% (30mM) a 1,5 L de disolución A. El pH del medio se ajustó a 5,3 mediante la adición de NH<sub>4</sub>OH. La disolución del medio se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C o mediante esterilización con filtro antes de su uso. Se añadió resazurina como indicador redox. La disolución del medio se transfirió de forma aséptica y anaerobia en una vasija CSTR de 1,5 L y se roció continuamente con N<sub>2</sub>. Una vez transferido a la vasija de fermentación, el estado de reducción y el pH del medio transferido podían ser medidos mediante sondas. El medio se calentó a 37°C y se agitó a 300 rpm.

Se añadió una disolución de sulfuro de sodio (3,75 mL de una disolución 0,2M), seguido por la disolución B con trazas metálicas (1,5 mL), Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (1,5 mL de una disolución 0,01M) y a continuación la disolución C (15 mL). Se ajustó el ORP de la disolución a aproximadamente -200 mV usando la disolución de Cr(II).

- 30 El fermentador B se convirtió en un biorreactor electroquímico modificando el reactor CSTR con dos electrodos de acero inoxidable. El cátodo se extendió en el medio nutritivo líquido mientras que el ánodo se extendió en una semicelda separada del medio nutritivo líquido mediante una membrana permeable a los iones. La semicelda del ánodo contenía una disolución 3M de KCl. Se aplicó una corriente directa a través de los electrodos con un potencial de 10-15 V, de forma que la corriente se mantenía a aproximadamente 7 mA a lo largo de la fermentación.

- 35 Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla de 2% H<sub>2</sub>, 33% N<sub>2</sub>, 44% CO, 21% CO<sub>2</sub> y 100% H<sub>2</sub>. Se inoculó un cultivo creciendo activamente de *Clostridium autoethanogenum* en el CSTR a un nivel de aproximadamente 10% (v/v). Durante este experimento, se añadió una disolución de Na<sub>2</sub>S con una tasa de aproximadamente 0,16 mMol/día. Los fermentadores fueron operados en condiciones esencialmente similares y el suministro de sustrato se aumentó como respuesta a los requerimientos de cada cultivo microbiano para comparar el fermentador de control (A) con el biorreactor electroquímico (B).

40

Fermentador	Día	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	Absorción total de CO (mmol/L)	Producción total de CO <sub>2</sub> (mmol/L)	Relación CO <sub>2</sub> producido/CO consumido
A	0,6	0,60*	1,0*	382	252	0,66
	0,8	0,78*	1,9*	604	398	0,66
	1,0	1,02	3,8	850	563	0,66
	1,2	1,28*	5,7*	1.121	749	0,67
	1,4	1,59*	7,6*	1.427	962	0,67
	1,6	1,90*	9,5*	1.783	1.209	0,68

	1,8	2,12	12,1	2.205	1.500	0,68
	2,0	2,40	14,9	2.711	1.848	0,68
B	0,6	0,70*	1,0*	591	272	0,46
	0,8	0,82*	1,8*	753	366	0,49
	1,0	1,16	3,3	940	483	0,51
	1,2	1,51*	5,0*	1.173	638	0,54
	1,4	1,80*	6,9*	1.470	837	0,57
	1,6	2,18*	8,7*	1.844	1.090	0,59
	1,8	2,61	10,9	2.308	1.403	0,61
	2,0	3,00	13,7	2.869	1.778	0,62

\* Extrapolado a partir de la representación gráfica de los parámetros de fermentación

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

10 A lo largo de esta descripción y en cualquiera de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera de otro modo, las palabras “comprende”, “que comprende” y similares, deben interpretarse en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo, es decir en el sentido de “incluyendo, pero sin estar limitados a”.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un método para la fermentación microbiana de un sustrato que comprende dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), donde el método comprende aplicar un potencial eléctrico a través de un caldo de fermentación que comprende un microorganismo y un medio nutritivo acuoso, en el que la fermentación convierte el CO<sub>2</sub> en productos mediante la vía de Wood-Ljungdahl.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el sustrato comprende además H<sub>2</sub>.
- 3.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO<sub>2</sub> produce uno o más producto(s), incluyendo dicho(s) producto(s) alcohol(es) y/o ácido(s).
- 10 4.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la aplicación de dicho potencial eléctrico da lugar a la electrolisis que se produce en el caldo de fermentación.
- 5.- El método según la reivindicación 4, en el que el voltaje se aplica a través de dos electrodos para generar una corriente directa entre ellos, estando dichos electrodos sumergidos en un electrolito.
- 6.- El método según la reivindicación 5, en el que el voltaje tiene un potencial de al menos 2V.
- 15 7.- El método según la reivindicación 5, en el que el voltaje está controlado para permitir una corriente esencialmente constante a través del electrolito.
- 8.- El método según la reivindicación 7, en el que la corriente esencialmente constante a través del electrolito se mantiene por encima de aproximadamente 1 mA.
- 9.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se proporcionan uno o más mediadores de lanzadera de electrones en el caldo de fermentación.
- 20 10.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la captura de carbono se mejora con respecto a la misma fermentación realizada sin aplicar dicho potencial eléctrico.
- 11.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el crecimiento microbiano de un microorganismo está aumentado con respecto a la misma fermentación realizada sin aplicar dicho potencial eléctrico.
- 25 12.- Un método de fermentación de un sustrato que comprende CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, en el que al menos una parte del H<sub>2</sub> se usa para producir uno o más equivalentes de reducción, donde el método incluye proporcionar uno o más electrones a la fermentación de forma que la cantidad de H<sub>2</sub> usada para producir uno o más equivalentes de reducción disminuye con respecto a la misma fermentación realizada sin aplicar dicho potencial eléctrico.
- 13.- El método según la reivindicación 12, en el que se usan uno o más equivalentes de reducción para fijar carbono en la masa celular y/o uno o más producto(s).
- 30 14.- El método según la reivindicación 13, en el que el uno o más producto(s) son ácido(s) y alcohol(es).



FIGURA 1

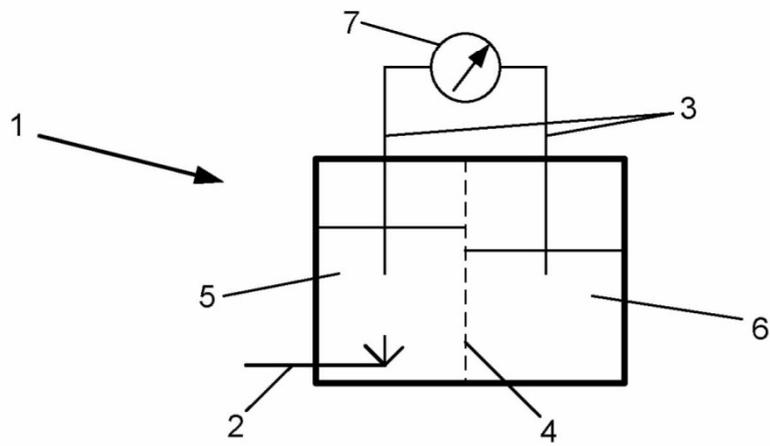


FIGURA 2