

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 380**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

C12P 7/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013** **PCT/NZ2013/000052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13147621**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013** **E 13769156 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2831249**

54 Título: **Método de fermentación**

30 Prioridad:

30.03.2012 US 201261618207 P

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

20.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MIHALCEA, CHRISTOPHE y
HARYANTO, PRANA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 380 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 de fermentación

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere de forma general a métodos para aumentar la eficiencia del crecimiento microbiano y la producción de productos, tales como alcoholes y ácidos por fermentación microbiana. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para producir alcoholes, particularmente etanol, por fermentación microbiana de sustratos que contienen monóxido de carbono.

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 2002 se estimó en 10,8 mil millones de galones (40,9 mil millones de litros). También se ha previsto que el mercado global de la industria de etanol como combustible crezca 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 de 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 o 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 de fermentación tradicionales basados en levaduras que usan carbohidratos derivados de cultivos, tales como la 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 carbohidratos está influido por su valor como alimentación humana o animal, mientras que 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.

30 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.

35 Se ha reconocido desde hace tiempo que se pueden usar procedimientos catalíticos para convertir gases que consisten principalmente en CO y/o CO e hidrógeno (H₂) en varios combustibles y productos químicos. Sin embargo, 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 una mayor especificidad, mayores rendimientos, menor coste energético y mayor resistencia al envenenamiento.

40 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) de 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 el CO a varios productos finales, principalmente CO₂, H₂, metano, n-butanol, acetato y etanol. Aunque usan el CO como única fuente de carbono, todos estos organismos producen al menos dos de estos productos finales.

45 Se ha demostrado que las bacterias anaeróbicas, tales como las del género *Clostridium*, producen etanol a partir de CO, CO₂ y H₂ 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 WO 02/08438. También se sabe que la bacteria *Clostridium autoethanogenum* sp produce etanol a partir de gases (Aribini *et al.*, *Archives of Microbiology* 161, págs. 345-351 (1994)).

55 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 un problema 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 gases de efecto invernadero.

La importancia de controlar los parámetros del medio nutritivo líquido usado para el cultivo de bacterias o microorganismos en un biorreactor usado para la fermentación ha sido reconocido en la técnica. El documento NZ 556615, presentado el 18 de julio de 2007, describe, en particular la manipulación del pH y del potencial redox de dicho medio nutritivo líquido. Por ejemplo, en el cultivo de bacterias acetogénicas anaeróbicas, elevando el pH del cultivo por encima de aproximadamente 5,7 manteniendo a la vez el potencial redox del cultivo a un nivel bajo (-400 mV o menos), las bacterias convierten el acetato producido como subproducto de la fermentación a etanol con una tasa mucho mayor que en condiciones de menor pH. El documento NZ 556615 reconoce además que se pueden usar diferentes niveles de pH y potenciales redox para optimizar las condiciones dependiendo del principal papel que las bacterias están realizando (es decir, crecimiento, producción de etanol a partir de acetato y un sustrato gaseoso que contiene CO o producción de etanol a partir de un sustrato gaseoso que contiene CO).

Los documentos US 7.078.201 y WO 02/08438 también describen la mejora de los procedimientos de fermentación para producir etanol variando las condiciones (p. ej., pH y potencial redox) del medio nutritivo líquido en el que se realiza la fermentación.

El pH del medio nutritivo líquido puede ajustarse añadiendo al medio uno o más agentes de ajuste del pH o tampones. Por ejemplo, se pueden usar bases tales como NaOH y ácidos tales como el ácido sulfúrico para aumentar o disminuir el pH según sea necesario. El potencial redox puede ser ajustado añadiendo uno o más agentes reductores (p. ej., viológeno de metilo) o agentes oxidantes.

Procedimientos similares se pueden usar para producir otros alcoholes, tales como el butanol, como será evidente para un experto en la técnica.

Independientemente de la fuente usada para alimentar la reacción de fermentación, se pueden producir problemas cuando hay cortes en el suministro. Más particularmente, dichas interrupciones pueden ser perjudiciales para la eficiencia de los microorganismos usados en la reacción y, en algunos casos, pueden ser nocivos para ellos. Por ejemplo, si se usa gas CO de una corriente de gas residual industrial en reacciones de fermentación para producir ácidos/alcoholes, puede haber periodos de tiempo en los que la corriente no se produzca. Durante dichos periodos de tiempo, los microorganismos usados en la reacción pueden ir a hibernación. Cuando la corriente esté disponible de nuevo, puede haber un retraso antes de que los microorganismos sean totalmente productivos en la realización de la reacción deseada.

Las fuentes de azufre, tales como la cisteína y/o el sulfuro, también se usan para alcanzar un ORP (potencial redox) adecuado del caldo de fermentación antes de la inoculación. Sin embargo, dichos agentes reductores son lentos y tienen un poder reductor limitado. Además, cuando se usan estos compuestos que contienen azufre para reducir el ORP de un medio de fermentación, ellos mismos son oxidados. Por ejemplo, la cisteína es oxidada al dímero cistina. Se considera que la forma reducida de estos compuestos es esencialmente más biodisponible como fuente de azufre para el consumo por un cultivo microbiano que la forma oxidada. Por lo tanto, cuando se usa una fuente de azufre para disminuir el ORP de una reacción de fermentación, la concentración de azufre real disponible para el cultivo microbiano disminuirá. Consecuentemente, la identificación de un agente reductor mejorado o alternativo para usarlo con sistemas de fermentación anaeróbica usando gases que contienen monóxido de carbono como materia prima es un componente clave para asegurar tasas de producción de alcohol elevadas y costes de operación del procedimiento bajos.

Junto con los nutrientes principales, tales como el nitrógeno y el fósforo, el azufre tiene un papel importante en la fermentación del *C. autoehanogenum* anaerobio. El azufre es esencial para el microbio y es necesario para varios compuestos y enzimas que permiten la fermentación por el *C. autoehanogenum* del CO a ácido acético, etanol y butanodiol y para generar el ATP para crecimiento de la biomasa. El azufre es parte de una clase de compuestos biológicos denominados ferredoxinas y es una parte integral de muchas de las enzimas de Wood-Ljungdahl que fijan el CO gaseoso en la acetil CoA. Generalmente, la forma más reducida del azufre es asimilada en las proteínas funcionales. El microbio puede absorber H₂S directamente o en forma del ion hidrógenosulfuro y asimilarlo en las proteínas deseadas. Muchas de las enzimas que contienen azufre de los microbios también contienen iones de metales de transición, tales como Fe²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ y Mn²⁺. Como los sulfuros de estos metales tienen productos de solubilidad muy bajos a los valores cercanos al pH neutro, el H₂S libre o los metales de transición libres son generalmente escasos en dichos hábitats ya que la mayoría de los iones metálicos estarán enlazados en sulfuros metálicos insolubles y por lo tanto no son accesibles para los microbios.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un sistema y/o un procedimiento que vaya al menos de alguna forma hacia la superación de las desventajas anteriores o al menos para proporcionar al público una elección útil.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para producir uno o más productos por fermentación microbiana, comprendiendo el método:

- a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a un biorreactor que comprende un cultivo de uno o más microorganismos acetogénicos carboxidotróficos en un medio nutritivo líquido que comprende una fuente de azufre elegida entre el grupo que comprende SO_2 , H_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, S_8 , Na_2S , NaHS , cisteína, NH_4SO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$;
- 5 b) fermentar anaeróbicamente el sustrato para producir uno o más productos elegidos entre el grupo que comprende alcoholes, ácidos y sus mezclas;
- c) convertir la fuente de azufre en H_2S en una cámara de aire del biorreactor;
- d) ajustar la concentración de la fuente de azufre en el medio nutritivo líquido según la cantidad de H_2S medida en la cámara de aire; y
- 10 e) recuperar uno o más productos;

donde la concentración de H_2S en la cámara de aire se mantiene entre 1 ppm y 100 ppm.

El medio nutritivo líquido comprende al menos una fuente de azufre elegida entre el grupo que comprende SO_2 , H_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, S_8 , Na_2S , NaHS , cisteína, NH_4HSO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$.

- 15 Según un modo de realización de la invención, se proporciona un método para mejorar la eficiencia de la fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, incluyendo el método proporcionar una fuente de azufre alternativa a un medio nutritivo, de forma que el azufre esté disponible para uno o más microorganismos.

En modos de realización particulares de los aspectos anteriores, la fuente de azufre alternativa se elige entre el grupo que comprende ácido sulfuroso (H_2SO_3), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, S_8 , Na_2S , NaHS , SO_2 cisteína, NH_4HSO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$. En modos de realización particulares, la fuente de azufre alternativa es ácido sulfuroso.

- 20 En modos de realización particulares de los aspectos anteriores, la fuente de azufre es un producto residual de un procedimiento industrial. El procedimiento industrial puede incluir, pero sin estar limitado a ellos, la combustión de carbón o la combustión de petróleo en centrales eléctricas.

En modos de realización particulares, la una o más especies que contienen azufre pueden ser utilizadas en un cultivo microbiano.

- 25 En modos de realización particulares, el sustrato que comprende CO es gaseoso. En modos de realización particulares, el sustrato gaseoso comprende 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, la elaboración de productos no ferrosos, procedimientos de refinado de petróleo, gasificación de biomasa, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono,
- 30 producción de amoníaco, producción de metanol y elaboración de coque. En un modo de realización particular, el sustrato gaseoso comprende un gas obtenido de una planta de laminación de acero.

- 35 En algunos modos de realización, el sustrato que contiene CO contendrá generalmente 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% también pueden ser apropiados particularmente cuando también hay presente H_2 y CO_2 .

- 40 En modos de realización particulares, el alcohol producido por el procedimiento de fermentación es etanol. La reacción de fermentación puede producir también acetato.

La fuente de azufre se elige entre el grupo que comprende SO_2 , H_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, S_8 , Na_2S , NaHS , cisteína, NH_4HSO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$. En algunos modos de realización la fuente de azufre es el ácido sulfuroso. En algunos modos de realización, la fuente de azufre es el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$. En algunos modos de realización la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ se mantiene entre 1 mmol y 2,5 mmol.

- 45 En algunos modos de realización, hay una correlación entre la cantidad de la fuente de azufre proporcionada al cultivo y la cantidad de H_2S presente en la cámara de aire de la vasija/reactor de fermentación. En algunos modos de realización, el H_2S se controla como un indicador de la concentración de azufre en la fermentación.

- 50 La concentración de H_2S en la cámara de aire se mantiene entre 1 ppm y 100 ppm. En algunos modos de realización, al aumentar la cantidad de la fuente de azufre proporcionada al cultivo aumenta la concentración de H_2S en la cámara de aire, e inversamente al disminuir la cantidad de la fuente de azufre proporcionada al cultivo disminuye la concentración de H_2S en la cámara de aire.

En un modo de realización, el microorganismo se elige entre el grupo de organismos acetogénicos carboxidotróficos que comprende las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovate*, *Butyrivacterium methylotrophicum*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

En modos de realización particulares, el microorganismo se elige entre el grupo de microorganismos acetogénicos carboxidotróficos que comprende las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium coskatii* y *Clostridium carboxydivorans*. En un modo de realización, la bacteria acetogénica es la *Clostridium autoethanogenum*.

En un modo de realización, la reacción de fermentación es realizada por la cepa de *Clostridium autoethanogenum* depositada en el Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ) con el número identificativo de depósito 19630.

En un modo de realización, la reacción de fermentación es realizada por la cepa de *Clostridium autoethanogenum* depositada en el Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ) con el número identificativo de depósito 23693.

En modos de realización particulares, la fuente de azufre es un producto residual de un procedimiento industrial. En algunos modos de realización, la fuente de azufre es un producto residual de un procedimiento de elaboración de carbón.

Aunque la invención es, en líneas generales, como se ha definido anteriormente, no está limitada por ello y también incluye modos de realización de los que la siguiente descripción proporciona ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con más detalle y con referencia a las figura adjuntas en las que:

La figura 1 muestra la absorción de H_2 y la producción de H_2S en una fermentación con *C. autoethanogenum* usando H_2SO_3 como fuente de azufre.

La figura 2 muestra la absorción de H_2 y la producción de H_2S en una fermentación con *C. autoethanogenum* usando $(NH_4)HSO_3$ como fuente de azufre.

La figura 3 muestra la absorción de gas y la concentración de H_2S en el primer reactor de un sistema de dos reactores.

La figura 4 muestra la absorción de gas y la concentración de H_2S en el segundo reactor de un sistema de dos reactores.

La tabla 1 muestra los números de oxidación de varias fuentes de azufre alternativas.

La tabla 2 muestra la adición de $(NH_4)_2SO_3$ en un primer reactor, relacionada con otros parámetros de procedimiento.

La tabla 3 muestra la adición de $(NH_4)_2SO_3$ en un segundo reactor, relacionada con otros parámetros de procedimiento.

Descripción detallada de la invención

Fuente de azufre

El pH óptimo de la fermentación con *C. autoethanogenum* es aproximadamente pH 5. A pH 5, el S^{2-} está predominantemente protonado y existe principalmente como H_2S (que es un gas disuelto) y pequeñas cantidades de HS^- . El gas anterior se retira del biorreactor por aspersión de los gases alimentados a través del sistema. Por esta razón es necesario almacenar las disoluciones acuosas que contienen H_2S a valores de pH mayores para atrapar el azufre en forma de ion sulfuro y añadir solo volúmenes pequeños de la disolución en la vasija de fermentación para evitar perder el azufre del sistema antes de que pueda ser utilizado por el microbio. Dichas disoluciones de elevado pH son muy corrosivas y también tienden a formar precipitados con la mayoría de los elementos, bien por formación de sulfuros insolubles o bien por precipitación de hidróxidos insolubles. La naturaleza corrosiva y de fácil precipitación de la disolución requiere que haya una separación estricta de esta disolución y los otros componentes del medio.

Para evitar estos problemas se han identificado y probado varias fuentes de azufre alternativas, para determinar la capacidad de la *C. autoethanogenum* para utilizar estas fuentes de azufre. La tabla 1 muestra varios compuestos azufrados, su número de oxidación y la capacidad de la *C. autoethanogenum* para utilizarlos.

El ácido sulfuroso (H_2SO_3) ha sido identificado como una fuente de azufre alternativa. El ácido sulfuroso es un ácido mucho más fuerte que el H_2S y a pH 5 el ácido estará cuantitativamente desprotonado y permanecerá en disolución como ion bisulfito. Las disoluciones acuosas pueden almacenarse por lo tanto en el intervalo de pH sin el problema adicional de la precipitación de hidróxido o corrosión extensa. La dosificación del azufre en el biorreactor también es

más fácil ya que los microbios convierten el SO_2 dentro de la celda en el H_2S necesario para su anabolismo. Las pérdidas de H_2S por la aspersión de otros gases de alimentación pueden ser minimizadas de esta forma. El azufre en las formas de ácido sulfuroso, H_2SO_3 o NH_4HSO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ pueden mezclarse en el medio antes de proporcionar el medio nutritivo al biorreactor. Esto aumenta la eficiencia de la fermentación eliminando la necesidad de un sistema de bombeo y un bucle de control necesarios para la adición continua de H_2S en sistemas previos.

Adicionalmente se ha identificado que usando ácido sulfuroso H_2SO_3 o NH_4HSO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ como fuente de azufre elimina la necesidad de separar la disolución de otros componentes del medio. A pH 6, la disolución es casi neutra y las disoluciones son incoloras y claras y no emiten gases, lo que hace que el almacenamiento sea muy fácil. Otra ventaja es que los bisulfitos de NH_4^+ y Na^+ (las sales que contienen hidrógeno del ácido sulfuroso) se disuelven muy fácilmente en la disolución.

Se ha encontrado que el ácido sulfuroso es tóxico para la mayoría de los microorganismos. Los inventores han encontrado de forma sorprendente que controlando la tasa de adición de ácido sulfuroso al caldo de fermentación, el cultivo microbiano es capaz de utilizar el ácido sulfuroso como fuente de azufre, sin perjuicio del crecimiento y la producción del cultivo.

Los inventores han identificado que sobrecargar el cultivo con ácido sulfuroso es perjudicial y puede producir la muerte del cultivo. Para superar este problema, se añade el ácido sulfuroso gradualmente a la fermentación. En algunos modos de realización, el ácido sulfuroso se añade en forma de goteo continuo a la fermentación. Debido a la toxicidad del ácido sulfuroso a elevadas concentraciones, es necesario controlar la cantidad de ácido sulfuroso proporcionada al cultivo y ajustar el flujo del ácido al biorreactor si la cantidad de ácido sulfuroso disponible para el cultivo sube por encima o cae por debajo de un intervalo predeterminado.

La fuente de azufre en forma de ácido sulfuroso es absorbida rápidamente por el cultivo microbiano. La conversión del ácido sulfuroso por el cultivo microbiano da lugar a la producción de H_2S que se libera en la cámara de aire del biorreactor. El caudal de ácido sulfuroso suministrado al biorreactor puede ser controlado mediante la monitorización de la concentración de H_2S en la cámara de aire del biorreactor. Niveles elevados de H_2S en la cámara de aire son indicativos de concentraciones elevadas de ácido sulfuroso en el medio nutritivo líquido. Dada la toxicidad del ácido sulfuroso a elevadas concentraciones, es deseable controlar la concentración del ácido sulfuroso en el medio nutritivo líquido. En algunos modos de realización de la invención, se ha encontrado que es adecuado mantener la concentración de H_2S en la cámara de aire a menos de 500 ppm, o menos de 300 ppm, o menos de 200 ppm, o menos de 150 ppm, o menos de 100 ppm, o menos de 80 ppm o menos de 50 ppm. En algunos modos de realización, la concentración de H_2S en la cámara de aire se mantiene a aproximadamente 100 ppm. En algunos modos de realización, la concentración de H_2S en la cámara de aire se mantiene en un intervalo de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunos modos de realización, la concentración de H_2S en la cámara de aire se mantiene en un intervalo de aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunos modos de realización, la concentración de H_2S en la cámara de aire se mantiene en un intervalo de aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 90 ppm.

El gas SO_2 es un producto residual de las centrales eléctricas de carbón y ha sido la causa de problemas medioambientales en forma de lluvia ácida. Las centrales eléctricas de carbón deben filtrar ahora sus emisiones de azufre y se han elaborado tratados para reducir dicha contaminación. La capacidad de la *C. autoethanogenum* para utilizar el SO_2 permite la captura y utilización de productos residuales.

El biorreactor

La fermentación puede realizarse 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 puede alimentar el caldo de fermentación del reactor de crecimiento y en el que se puede producir la mayor parte del producto de fermentación (p. ej., etanol y acetato). El biorreactor de la presente invención está adaptado para recibir un sustrato que contiene CO y/o H_2 .

El sustrato que contiene CO y/o H_2

El sustrato que contiene CO y/o H_2 se captura o se extrae del procedimiento usando cualquier método conveniente. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO y/o H_2 , puede ser también adecuado tratarlo para eliminar cualquier impureza no deseada, tal como las partículas de polvo antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato puede ser filtrado o lavado usando métodos conocidos.

El sustrato que comprende CO , preferiblemente un sustrato gaseoso, se puede obtener como subproducto en cualquier etapa del procedimiento del reformado con vapor. Dichas etapas incluyen la etapa de reformado con vapor, la etapa de WGS y la etapa de PSA como se describe en la presente memoria.

Generalmente, el CO 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, Nº 3 / Octubre de 2002). Cuando se refiere una "corriente de gas" en la presente memoria, el término también incluye otras formas de transportar los componentes gaseosos de dicha corriente, tal como el método con un líquido saturado descrito anteriormente.

Composiciones del gas

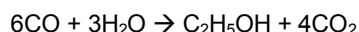
El sustrato que contiene CO puede contener cualquier proporción de CO, tal como al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% en volumen, de 40% a 95% de CO en volumen, de 40% a 60% de CO en volumen y de 45% a 55% de CO en volumen. En modos de realización particulares, el sustrato comprende aproximadamente 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 menores concentraciones de CO, tal como 2%, pueden ser también adecuados, particularmente cuando hay presente también H₂ y CO₂.

La presencia de H₂ no sería perjudicial para la formación del producto hidrocarbonado por fermentación. 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 H₂:CO de 2:1, o 1:1, o 1:2. En otros modos de realización, el sustrato que contiene CO comprende menos de aproximadamente 30% de H₂, o menos de aproximadamente 27% de H₂, o menos de aproximadamente 20% de H₂, o menos de aproximadamente 10% de H₂, o concentraciones menores de H₂, 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. En todavía otros modos de realización, el sustrato que contiene CO comprende más de 50% de H₂, o más de 60% de H₂, o más de 70% de H₂, o más de 80% de H₂, o más de 90% de H₂.

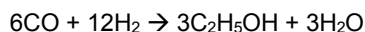
El sustrato también puede contener algo de CO₂, por ejemplo tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO₂ en volumen, o 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen.

Mezcla de corrientes

Puede ser adecuado mezclar una corriente de sustrato reformada que comprende CO y H₂ con otra u otras corrientes adicionales con el fin de mejorar la eficiencia, la producción de alcohol y/o la captura global de carbono de la reacción de fermentación. Sin pretender estar vinculado por la teoría, en algunos modos de realización de la presente invención, la bacteria carboxidotrófica convierte el CO en etanol según la siguiente reacción:



Sin embargo, en presencia de H₂, la conversión global puede ser como sigue:



Consecuentemente, las corrientes con un elevado contenido de CO se pueden mezclar con corrientes de sustrato reformadas que comprenden CO y H₂ para aumentar la relación CO: H₂ para optimizar la eficiencia de la fermentación. A modo de ejemplo, las corrientes residuales industriales, tales como los gases de escape de una planta de laminación de acero tienen un contenido de CO elevado, pero no contienen o incluyen mínimas cantidades de H₂. Por lo tanto, puede ser deseable mezclar una o más corrientes que comprenden CO y H₂ con la corriente residual que comprende CO antes de suministrar la corriente de sustrato mezclada al fermentador. La eficiencia global, la productividad en alcohol y/o la captura global de carbono de la fermentación dependerán de la estequiometría del CO y H₂ en la corriente mezclada. Sin embargo, en modos de realización particulares, la corriente mezclada puede comprender esencialmente CO y H₂ en las siguientes relaciones molares 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1 ó 1:2.

Además, puede ser adecuado proporcionar CO y H₂ en relaciones particulares en diferentes etapas de la fermentación. Por ejemplo, las corrientes de sustrato con un contenido en H₂ relativamente elevado (tal como 1:2 de CO:H₂), pueden ser suministradas a la etapa de fermentación durante la puesta en marcha y/o las fases de crecimiento microbiano rápido. Sin embargo, cuando la fase de crecimiento se ralentiza, de forma que el cultivo se mantiene con una densidad microbiana esencialmente estacionaria, el contenido de CO puede ser aumentado (tal como al menos 1:1 o 2:1 o superior, donde la concentración de H₂ puede ser mayor o igual a cero).

La mezcla de corrientes puede tener también ventajas adicionales, particularmente en casos en los que una corriente residual que comprende CO es de naturaleza intermitente. Por ejemplo, una corriente residual intermitente que comprende CO puede mezclarse con una corriente de sustrato reformada esencialmente continua que comprende CO y H₂ y ser suministrada al fermentador. En modos de realización particulares de la invención, la composición y el caudal de la corriente mezclada esencialmente continua pueden ser variados según la corriente intermitente con el fin

de mantener la provisión de una corriente de sustrato de composición y caudal esencialmente continuos en el fermentador.

Fermentación

- Se conocen procedimientos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos. Procedimientos 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.

Microorganismos

- La fermentación se realiza usando un cultivo de una o más cepas de bacterias acetogénicas carboxidotróficas. En varios modos de realización, la bacteria carboxidotrófica se elige entre *Moorella*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina* y *Desulfotomaculum*. 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*, tales 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 carboxydivorans* (Liou *et al.*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33, págs. 2.085-2.091); *Clostridium ragsdalei* (WO2008/028055) 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* (Simpá *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.

- En un modo de realización, el microorganismo se elige entre el grupo de organismos acetogénicos carboxidotróficos que comprende las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxydivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovate*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

- Estos acetógenos carboxidotróficos se definen por su capacidad para utilizar y crecer quimioautotróficamente en fuentes gaseosas con un átomo de carbono (C1), tales como el monóxido de carbono (CO) y el dióxido de carbono (CO₂) con el monóxido de carbono (CO) y/o el hidrógeno (H₂) como fuente de energía en condiciones anaeróbicas formando acetil CoA, acetato y otros productos. Comparten el mismo modo de fermentación, la vía de Wood-Ljungdahl o vía reductora de la acetil CoA, y se definen por la presencia de la serie de enzimas que consiste en monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH), hidrogenasa, formato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintetasa, metilén-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metilén-tetrahidrofolato reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil CoA sintasa (CODH/ACS), cuya combinación es característica y única de este tipo de bacterias (Drake, Küsel, Matthies, Wood, & Ljungdahl, 2006). Al contrario del crecimiento quimioheterotrófico de las bacterias fermentadoras de azúcar que convierten el sustrato en biomasa, metabolitos secundarios y piruvato a partir de los que se forman los productos (bien mediante la vía acetil CoA o directamente), en los acetógenos el sustrato es canalizado directamente en acetil CoA, a partir del que se forman los productos, biomasa y metabolitos secundarios.

- En un modo de realización, el microorganismo se elige entre un grupo de Clostridia carboxidotróficos que comprende las especies *C. autoethanogenum* JAI-1^T (DSM10061) (Abrini, Naveau, & Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC^T (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, & Yang, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (patente estadounidense 5.593.886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (patente estadounidense 6.368.819), *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (patente estadounidense 6.368.819), o "*C. ragsdalei* P11^T" (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055) y cepas relacionadas, tales como "*C. coskati*" (patente estadounidense 2011/0229947), y sus cepas mutantes, tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. "Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*". Tesis doctoral, North Carolina State University, 2010).

- Estas cepas forman un subgrupo dentro del grupo I de rRNA clostridial (Collins *et al.*, 1994), que tiene al menos 99% de identidad a nivel del gen rRNA 16s aunque son distintas especies como se ha determinado por reasociación DNA-DNA y experimentos de huella de DNA (WO 2008/028055 y patente estadounidense 2011/0229947).

Las cepas de este grupo se definen por las características comunes, teniendo tanto genotipo como fenotipo similares, y todas ellas comparten el mismo modo de conservación de la energía y metabolismo fermentativo. Las cepas de este grupo no tienen citocromos y conservan la energía mediante un complejo Rnf.

Todas las cepas de este grupo tienen un tamaño genómico de aproximadamente 4,2 MBp (Köpke *et al.*, 2010) y una composición de GC de aproximadamente 32% molar (Abrini *et al.*, 1994; Köpke *et al.*, 2010; Tanner *et al.*, 1993) (WO 2008/028055; patente estadounidense 2011/0229947), y conservan operones genéticos clave esenciales que codifican para enzimas de la vía de Wood-Ljungdahl (monóxido de carbono deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintetasa, metilen-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metilen-tetrahidrofolato reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil CoA sintasa, hidrogenasa, formato deshidrogenasa, complejo Rnf (*mfCDGEAB*), piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, aldehído:ferredoxina oxidorreductasa (Köpke *et al.*, 2010, 2011). Se ha encontrado que la organización y el número de los genes de la vía de Wood-Ljungdahl, responsables de la absorción de gas, es la misma en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias nucleicas y de aminoácidos (Köpke *et al.*, 2011).

Todas las cepas tienen una morfología y tamaño similares (las células de crecimiento logarítmico son entre 0,5-0,7 x 3-5 μm), son mesófilas (temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C) y estrictamente anaerobias (Abrini *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1993) (WO 2008/028055). Además, todas ellas comparten los mismos rasgos filogenéticos principales, tales como el mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH óptimo inicial de 5,5-6), fuerte crecimiento autotrófico en gases que contienen CO con tasas de crecimiento similares y un perfil metabólico con etanol y ácido acético como principales productos finales de la fermentación, con pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formados en ciertas condiciones (Abrini *et al.*, 1994; Köpke *et al.*, 2011; Tanner *et al.*, 1993) (WO 2008/028055). Con todas las especies se ha observado producción de indol. Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización de sustratos de varios azúcares (p. ej., ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej., gluconato, citrato), aminoácidos (p. ej., arginina, histidina) u otros sustratos (p. ej., betaína, butanol). Se encontró que algunas de las especies eran auxótrofos para algunas vitaminas (p. ej., tiamina o biotina) mientras que otras no lo eran.

Por lo tanto, los rasgos descritos no son específicos de un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino que son más bien rasgos generales de los Clostridia carboxidotróficos que sintetizan etanol. Por lo tanto, la invención puede ser prevista para trabajar sobre estas cepas, aunque puede haber diferencias en las prestaciones.

En algunos modos de realización, el microorganismo se elige entre el grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*. En un modo de realización, el grupo también comprende *Clostridium coskatii*. En un modo de realización particular, el microorganismo precursor es el *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

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 de depósito identificativo 23693. En otros modos de realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características identificativas del número de depósito en el DSMZ, DSMZ 10061 o DSMZ 19630. Estas cepas tienen una tolerancia particular frente a cambios en la composición del sustrato, particularmente del H_2 y CO y por lo tanto son particularmente muy adecuadas para usarlas en combinación con un procedimiento de reformado por vapor.

El cultivo de las bacterias usadas en los métodos de la invención se puede realizar usando cualquier número de procedimientos conocidos en la técnica del cultivo y fermentación de sustratos usando bacterias anaeróbicas. A modo de ejemplos, 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.

Condiciones de fermentación

Se apreciará que para que se produzca el crecimiento de las bacterias y la fermentación del CO a alcohol, además del 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 producción de productos hidrocarbonados mediante la fermentación 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 WO 02/08438, WO2007/117157 y WO2008/115080 mencionados anteriormente.

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 deben 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 sea limitante y concentraciones máximas del producto para evitar la inhibición del producto. Las condiciones adecuadas se describen en los documentos WO02/08438, WO07/115157 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 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 donde puede ser absorbida por el microorganismo como fuente de carbono para la producción de productos hidrocarbonados. 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. Además, como una tasa de conversión de CO a hidrocarburo 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 requerido 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.

Los beneficios de realizar la fermentación del gas a hidrocarburo 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 2,1 atm y 5,3 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.

También es deseable 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 hidrocarburo producto sea consumido por el cultivo.

Productos de fermentación

Los métodos de la invención se pueden usar para producir cualquiera de varios productos hidrocarbonados. Estos incluyen alcoholes, ácidos y/o dioles. Más particularmente, la invención puede ser aplicable a la fermentación para producir acetato, butirato, propionato, caproato, etanol, propanol, butanol, 2,3-butanodiol, isopropanol, propilengliol, butadieno, isobutileno y etileno. Estos y otros productos pueden ser de valor para un huésped de otros procedimientos tales como la producción de plásticos, productos farmacéuticos o agroquímicos. En un modo de realización particular, el producto de la fermentación se usa para producir hidrocarburos de rango gasolina (aproximadamente 8 átomos de carbono), hidrocarburos de diésel (aproximadamente 12 átomos de carbono) o hidrocarburos de combustible para reactores (aproximadamente 12 átomos de carbono).

La invención también proporciona que al menos una parte de un producto hidrocarbonado producido por la fermentación se reutiliza en el procedimiento de reformado con vapor. Esto puede realizarse porque los hidrocarburos distintos del CH₄ son capaces de reaccionar con vapor sobre un catalizador para producir H₂ y CO. En un modo de realización particular, se recicla el etanol para ser utilizado como materia prima para el procedimiento de reformado con vapor. En un modo de realización adicional, la materia prima hidrocarbonada y/o el producto se pasa a través de un pre-convertidor antes de ser utilizado en el procedimiento de reformado con vapor. El paso a través de un pre-convertidor completa parcialmente la etapa de reformado con vapor del procedimiento de reformado con vapor lo que puede aumentar la eficiencia de la producción de hidrógeno y reducir la capacidad requerida para el horno de reformado con vapor.

Los métodos de la invención también pueden ser aplicados a fermentaciones aeróbicas y a fermentaciones anaeróbicas o aeróbicas de otros productos incluyendo, pero sin limitarse a él, isopropanol.

Recuperación del producto

Los productos de la reacción de fermentación se pueden recuperar usando métodos conocidos. Los 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, 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.

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.

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

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 basados en la filtración para la generación de un caldo de fermentación sin células 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.

- 20 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.

- 25 Otros métodos para recuperar el acetato de un caldo de fermentación también son conocidos en la técnica y pueden ser utilizados. 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 caldos de fermentación. Con 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 ácido acético producto. El sistema de disolvente/codisolvente que contiene el ácido acético producto se separa a continuación del medio por destilación. A continuación, se puede usar una segunda etapa de destilación para purificar el ácido acético del sistema de disolvente/codisolvente.

- 35 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 caldo 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.

La biomasa recuperada del biorreactor puede experimentar una digestión anaeróbica para producir un producto de biomasa, preferentemente metano. Este producto de biomasa puede ser utilizado como materia prima para el procedimiento de reformado con vapor o utilizado para producir calor suplementario para impulsar una o más de las reacciones definidas en la presente memoria.

50 EJEMPLOS

Materiales y métodos para la puesta en marcha

Medios:

Componente del medio del biorreactor	Concentración por 1,0 L de medio
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,15 g
KCl	0,15 g
NaCl	0,12 g
H ₃ PO ₄ al 85%	0,38 mL
Mezcla metálica 1 (Fe 0,1M, Ni 0,005M, Zn 0,005M)	1 mL
Mezcla metálica 2 (0,01M B, Mn, Co, Se, Mo 0,01M)	0,2 mL
Disolución de wolframio 0,01M	0,2 mL
Rezasurina (2 g/L)	0,5 mL
Disolución de vitamina B (LS03)	10 mL
Cisteína	2,5 g

Componente del medio de las botellas de suero	Concentración por 1,0 L de medio
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,37 g
KCl	0,15 g
NaCl	0,12 g
H ₃ PO ₄ al 85%	0,5 mL
CH ₃ COONH ₄	1 g
Mezcla metálica 1 (Fe 0,1M, Ni 0,005M, Zn 0,005M)	1 mL
Mezcla metálica 2 (0,01M B, Mn, Co, Se, Mo 0,01M)	0,2 mL
Disolución de wolframio 0,01M	0,2 mL
Rezasurina (2 g/L)	0,75 mL
Disolución de vitamina B (LS03)	10 mL
Cisteína	0,5 g
Extracto de levadura	1 g

Disolución de vitamina B (LS03)	Por L de disolución
Tiamina HCl	50 mg
Riboflavina	50 mg
Ácido nicotínico	50 mg
Ácido pantoténico	50 mg
Piridoxina HCl	10 mg
Biotina	20 mg
Ácido fólico	20 mg
Ácido 4-aminobenzoico	50 mg
Cianocobalamina	50 mg
Ácido lipoico	50 mg
Agua destilada	Hasta 1 L

Mezcla metálica 1	Por L de disolución
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	19,35 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,19 g
ZnCl_2	0,69 g

Mezcla metálica 2	Por L de disolución
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,38 g
HBO_4	0,62 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,98 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,42 g
Na_2SeO_3	1,73 g
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,29 g

5 Fermentación en botella de suero

Se realizó la incubación inyectando 1 mL de un material liofilizado de *Clostridium autoethanogenum* en una botella de suero anaeróbico de 234 mL que contenía 50 mL de medio. La cámara de aire de la botella de suero se purgó con 30 psi (2,04 atm) de RMG. Se almacenó en un incubador con agitación a una temperatura mantenida de 37°C. Después de dos días de incubación o cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó 0,2, se subcultivaron en 8 botellas de suero.

10 Fermentación en biorreactor – Ejemplos 1 y 2

Los medios se prepararon mezclando todos los ingredientes en 5 L de agua destilada con la excepción de la disolución de Vitamina B y la cisteína. Se preparó un reactor CSTR de diez litros y se colocaron dentro de él 4,5 L de disolución del medio. A continuación se esterilizó el reactor en autoclave durante 30 minutos a 121°C. Después de la esterilización en autoclave, se dejó que el reactor se enfriara, se mantuvo a 37°C y se hizo anaeróbico mediante un flujo constante de gas N_2 y agitación a 200 rpm. Una vez frío, se añadieron las disoluciones de vitamina B y de cisteína usando jeringas con filtro de 0,2 μm . A continuación se ajustó el pH y se mantuvo a 5,3 usando una disolución de NH_4OH 5M.

Dos horas antes de la inoculación, se cambió el gas N₂ por 100 mL/min de RMG y el medio se redujo adicionalmente usando una disolución de Cr²⁺ 0,2M a -250 mV. Se inoculó con 400 mL del cultivo en botella de suero de *Clostridium autoethanogenum*. La fermentación se inició como un lote con un ligero aumento de gas y agitación a lo largo del tiempo. Dos días después de la inoculación, el cultivo se hizo continuo, todavía con un ligero impulso, y finalmente se mantuvo estable con 550 mL/min de RMG y agitación a 400 rpm.

Fermentación en biorreactor – Ejemplo 3

Dos reactores de 2 litros se llenaron con 1,5 L de medio que contenía todos los metales, ácido fosfórico, vitaminas B (según se especifica en las tablas anteriores). El medio se desgasificó a continuación usando un gas industrial que tenía la siguiente composición: aproximadamente 50% de CO, 20% de CO₂, 28% de N₂ y 2% de H₂. Se añadió (NH₄)₂SO₃ 0,12M (pH 6,0) con una tasa de 0,2 mL/h para suministrar azufre en el medio antes de la inoculación. El ORP (electrodo de Ag/AgCl) se ajustó adicionalmente a -200 mV con Cr²⁺ 0,2M antes de inoculación con 200 mL de cultivo de un fermentador de semillas operado de forma continua con una biomasa de aproximadamente 2 g/L. Se controlaron cuidadosamente el pH, ORP, absorción de gas y H₂S en la cámara de aire durante las horas siguientes para asegurar un arranque exitoso. El pH se controló gestionando el suministro óptimo de gas al cultivo y adicionalmente se confirmó por un control de pH automático (a 5,0) con NH₄OH 5M. Durante las primeras 24 horas, el cultivo era un fermentador por lotes y a continuación se cambió a modo continuo suministrando un medio (NaCl 2mM, KCl 2mM, MgCl₂ 0,5mM, CaCl₂ 1mM, vitaminas B, ácido fosfórico 5mM, mezcla de metales) con una tasa para obtener una tasa de dilución entre 2 y 3 y suministrar al mismo tiempo (NH₄)₂SO₃ y antiespumante con las tasas apropiadas.

(NH₄)₂SO₃ 0,12M (pH a 6,0 con HCl conc.) como fuente de azufre – caudal ajustado de forma que el H₂S en la cámara de aire < 100 ppm.

Antiespumante (poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)) (CAS 9003-11-6) (10 µL/h).

El experimento en los reactores de 1,5 L se realizó como un sistema con 2 fermentadores. Ambos reactores presentan reciclado de la celda. Se usaron cartuchos de membrana de fibra hueca con un tamaño de poro de 0,1 µm para el reciclado de la celda. Cuando los reactores se juntan en un sistema de 2 fermentadores, el filtrado resultante del reciclado de la celda y el residuo se transfieren directamente en el fermentador posterior. Así, la relación entre el filtrado y el residuo sigue siendo una estimación basada en las tasas medidas en el flujo.

Ejemplo 1: H₂SO₃ como fuente de azufre

Antecedentes:

Este experimento se realizó en un fermentador de semillas operado de forma continua, estable en un sistema de único reactor. El principal objetivo del fermentador de semillas fue proporcionar un inóculo de arranque para la fermentación en otros biorreactores. Por lo tanto, este fermentador se mantuvo estable y se abasteció insuficientemente con un suministro bajo de gas y agitación. Un fermentador de semillas normalmente opera durante aproximadamente uno o dos meses antes de ser detenido y reiniciado (para reducir el riesgo de contaminación). Se realizaron los experimentos en el cultivo después de dos meses de tiempo de operación estable continuo. Los perfiles de un fermentador de semillas son diferentes de los de los sistemas de fermentación de altas prestaciones.

El objetivo de estos experimentos era encontrar una fuente alternativa de azufre para la *C. autoethanogenum* y otros microorganismos acetogénicos carboxidotróficos. Se ha descubierto que la *C. autoethanogenum* es capaz de utilizar una fuente de azufre de Na₂S (bien por goteo de la disolución directamente en el fermentador o por goteo de la disolución en un contenedor cerrado relleno con H₃PO₄ y suministrando el H₂S liberado en el fermentador). La *C. autoethanogenum* también es capaz de consumir cisteína y liberar H₂S y en el pasado se ha demostrado que el S₈ es también efectivo. Estos experimentos se centraron en el H₂SO₃ porque tiene ventajas en comparación con la fuente de azufre actual (Na₂S o cisteína). El H₂SO₃ es tóxico para la mayoría de los microorganismos por lo tanto podría actuar como desinfectante y como fuente de azufre. Además, el gas SO₂ es un producto residual de las centrales eléctricas de carbón y ha producido problemas medioambientales en forma de lluvias ácidas. Desde entonces, las centrales eléctricas de carbón han filtrado sus emisiones de azufre y se han elaborado tratados internacionales para reducir dicha contaminación.

Método:

Se bombeó SO₂ ~0,6M en disolución acuosa en un fermentador de 10 L usando una bomba de jeringa. Los indicadores de prestaciones son H₂S en la cámara de aire y absorción de H₂ y CO. Una fuente de azufre de trabajo debería producir H₂S y dar una absorción estable de H₂ y CO. La absorción de H₂ es un indicador temprano del estado de salud de los microbios.

Resultados

La concentración de aproximadamente 0,6M con una tasa de bombeo de 1 mL/h dio una cantidad excesiva de H₂S en la cámara de aire (aproximadamente 600 ppm). Para reducir el H₂S producido, la disolución se diluyó 10x y la tasa de bombeo se ajustó para obtener el valor adecuado.

- 5 La figura 1 muestra la absorción de hidrógeno y la producción de H₂S del biorreactor.

Con una tasa de bombeo de 2 mL por hora, el cultivo casi no produjo H₂S y la absorción de H₂ fue inestable y decreciente.

- 10 Con una tasa de bombeo de 3 mL por hora, la cantidad de H₂S en la cámara de aire fue de aproximadamente 60-70 ppm de H₂S. Cuando la tasa de bombeo fue aumentada a 3,5 mL por hora, la cantidad de H₂S fluctuó entre aproximadamente 20 ppm de H₂S hasta casi cero. La absorción de H₂ fue muy estable. Aumentar la tasa de bombeo a 4 mL por hora produjo cantidades excesivas de H₂S.

Ejemplo 2: (NH₄)HSO₃ como fuente de azufre**Antecedentes:**

- 15 Este experimento fue una continuación del experimento con H₂SO₃. El H₂SO₃ es muy ácido y en forma de SO₂ en agua que en su pH real libera gas SO₂ tóxico que puede producir la muerte y problemas de seguridad. El experimento separado de almacenar esta disolución en una bolsa IV (método habitual de suministro de Na₂S en un fermentador) mostró que incluso aunque la bolsa no fue dañada, se infló debido a la acumulación de gas SO₂.

- 20 Para proporcionar una disolución más segura, se ajustó el pH del SO₂ en agua (H₂SO₃) a 6 usando NH₄OH concentrado que produce (NH₄)HSO₃ seguro y casi sin olor. Esta disolución se ensayó a continuación en un fermentador de semillas.

Método:

Aproximadamente 0,6 M de SO₂ en disolución acuosa se hizo reaccionar con NH₄OH al 28% para llevar el pH hasta 6 y se diluyó 10x. La disolución se suministró a continuación al fermentador usando una bomba de jeringa.

Resultados:

- 25 La figura 2 muestra la absorción de H₂ y los niveles de H₂S en el biorreactor. Como se muestra en la figura 2, 4 mL por hora de disolución sin diluir produjo una cantidad excesiva de H₂S. Una tasa de 4 mL por hora de disolución diluida dio aproximadamente 80 ppm de H₂S.

- 30 Una tasa de 2 mL por hora de una disolución diluida a 1/10 dio una cantidad mínima de H₂S, sin embargo la absorción de H₂ disminuyó. Una tasa de 3 mL por hora de una disolución diluida a 1/10 produjo niveles bajos de N₂S y una absorción de H₂ estable.

Ejemplo 3: (NH₄)₂SO₃ como fuente de azufre**Método:**

- 35 Se usó (NH₄)₂SO₃ como fuente de azufre en un sistema de dos fermentadores. Se preparó una disolución de (NH₄)₂SO₃ 0,12M y el pH se ajustó a 6,0 con HCl concentrado. Esta disolución puede ser usada con tasas similares que la disolución de Na₂S 0,5M. La dosificación se ajusta para mantener el H₂S en la cámara de aire por debajo de 100 ppm. Mayores concentraciones de H₂S en la cámara de aire son indicativas de niveles de SO₂ en el caldo que podrían dañar potencialmente el cultivo. Las tablas 2 y 3 muestran que a concentraciones superiores de biomasa y mayores tasas de dilución y tasas de gas, la concentración de (NH₄)₂SO₃ necesaria para mantener los niveles de H₂S en los niveles objetivo aumenta. En el momento de la inoculación, hay que ser particularmente cuidadoso para no añadir demasiado (NH₄)₂SO₃. El H₂S como indicador solo está disponible después de la inoculación. El H₂S no estará presente en la cámara de aire antes de la inoculación. En este experimento se ha demostrado que la concentración óptima para el (NH₄)₂SO₃ es entre 1 y 3,5 mmol para un cultivo de elevadas prestaciones en continuo, dependiendo de la biomasa, flujo de gas y tasa de dilución. En el momento de la inoculación, la concentración debe ser menor de 0,3 mmol.

- 45 **Resultados:**

- 50 Se añadió (NH₄)₂SO₃ a una disolución a pH 6 para usarlo como una fuente de azufre alternativa. Se añadió el (NH₄)₂SO₃ a la fermentación con la misma tasa que una disolución Na₂S 0,5M. Durante el transcurso del experimento se mostró que era deseable mantener la concentración de (NH₄)₂SO₃ en disolución, de forma que la cantidad de H₂S en la cámara de aire del reactor se mantuviera a una concentración de menos de 100 ppm. Como se muestra en las figuras 3 y 4, la fermentación se mantuvo de forma estable usando (NH₄)₂SO₃ durante aproximadamente 40 días, demostrando la eficacia del (NH₄)₂SO₃ como fuente alternativa de azufre.

Se demostró una fermentación estable continua usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ con fuente de azufre para los microorganismos mientras que se mantuviera una concentración deseada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ en el caldo de fermentación entre 1 y 3,5 mmol y se mantuviera una concentración de H_2S en la cámara de aire de menos de 100 ppm.

- 5 La invención ha sido descrita en la presente memoria con referencia a algunos modos de realización preferidos, con el fin de permitir al lector poner en práctica la invención sin excesiva experimentación.

Cuando se ha hecho referencia en la descripción precedente a enteros que tienen equivalentes conocidos, dichos enteros se incorporan en la presente memoria como si se hubieran descrito individualmente.

Además, los títulos, encabezamiento o similares se proporcionan para mejorar la comprensión del lector de este documento, y no deben ser entendidos como limitantes del alcance de la presente invención.

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

- 15 A lo largo de esta memoria descriptiva y en cualquiera de las reivindicaciones siguientes, 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

1.- Un método para producir uno o más productos por fermentación microbiana, comprendiendo el método:

- 5 a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a un biorreactor que comprende un cultivo de uno o más microorganismos acetogénicos carboxidotróficos en un medio nutritivo líquido que comprende una fuente de azufre elegida entre el grupo que comprende SO₂, H₂SO₃, Na₂S₂O₄, S₈, Na₂S, NaHS, cisteína, NH₄SO₃ o (NH₄)₂SO₃;
- b) fermentar anaeróticamente el sustrato para producir uno o más productos elegidos entre el grupo que comprende alcoholes, ácidos y sus mezclas;
- c) convertir la fuente de azufre en H₂S en una cámara de aire del biorreactor;
- 10 d) ajustar la concentración de la fuente de azufre en el medio nutritivo líquido según la cantidad de H₂S medida en la cámara de aire; y
- e) recuperar uno o más productos;

donde la concentración de H₂S en la cámara de aire se mantiene entre 1 ppm y 100 ppm.

2.- El método según la reivindicación 1, en el que la fuente de azufre es ácido sulfuroso.

- 15 3.- El método según la reivindicación 2, en el que la concentración de ácido sulfuroso en el medio nutritivo líquido se mantiene entre 1 y 3,5 mmol.

4.- El método según la reivindicación 1, en el que el uno o más microorganismos carboxidotróficos se elige entre el grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium coskatii* y *Clostridium carboxydivorans*.

- 20 5.- El método según la reivindicación 4, en el que el microorganismo carboxidotrófico es el *Clostridium autoethanogenum*.

6.- El método según la reivindicación 4, en el que el microorganismo carboxidotrófico es la cepa de *Clostridium autoethanogenum* depositada en el Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ) con el número de depósito identificativo 19630.

- 25 7.- El método según la reivindicación 4, en el que el microorganismo carboxidotrófico es la cepa de *Clostridium autoethanogenum* depositada en el Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ) con el número de depósito identificativo 23693.

8.- El método según la reivindicación 1, en el que la fuente de azufre es un producto residual de un procedimiento industrial.

- 30 9.- El método según la reivindicación 1, en el que la fuente de azufre es un producto residual de un procedimiento de elaboración de carbón.

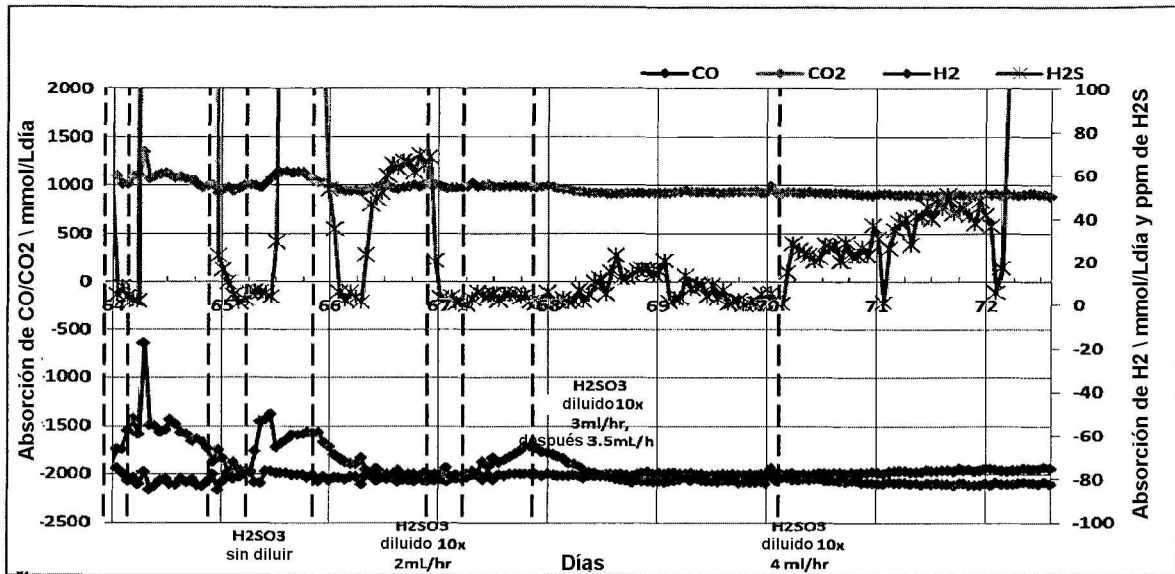


Fig. 1

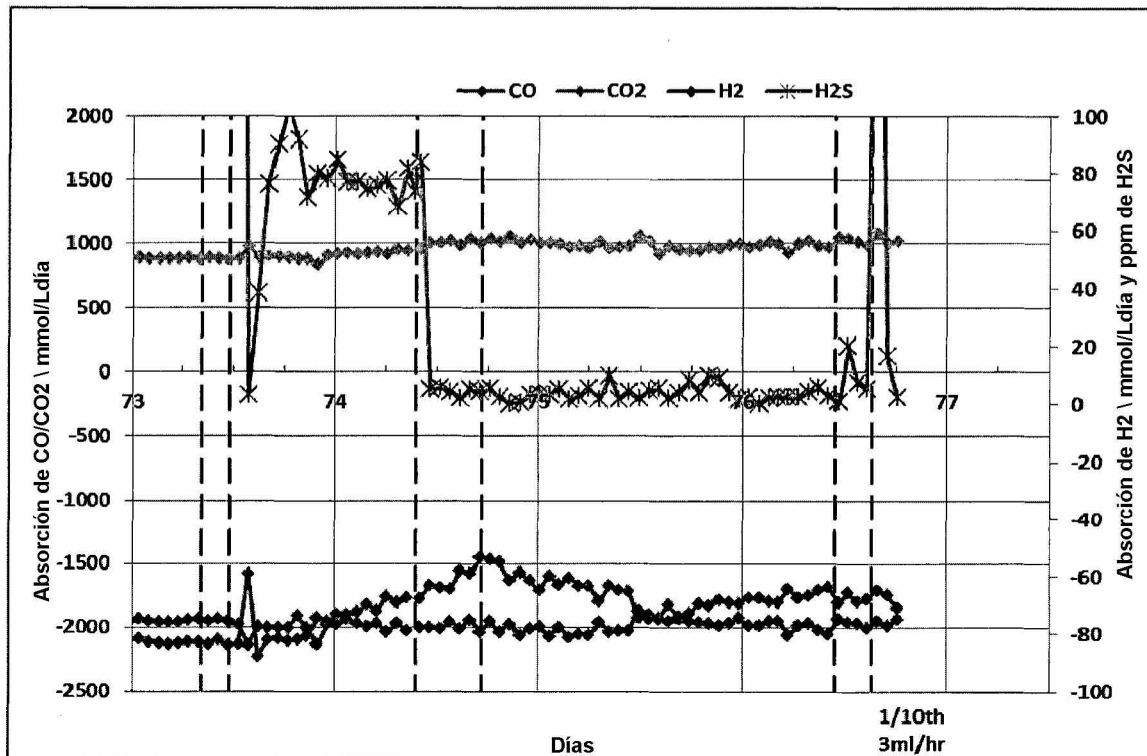


Fig. 2

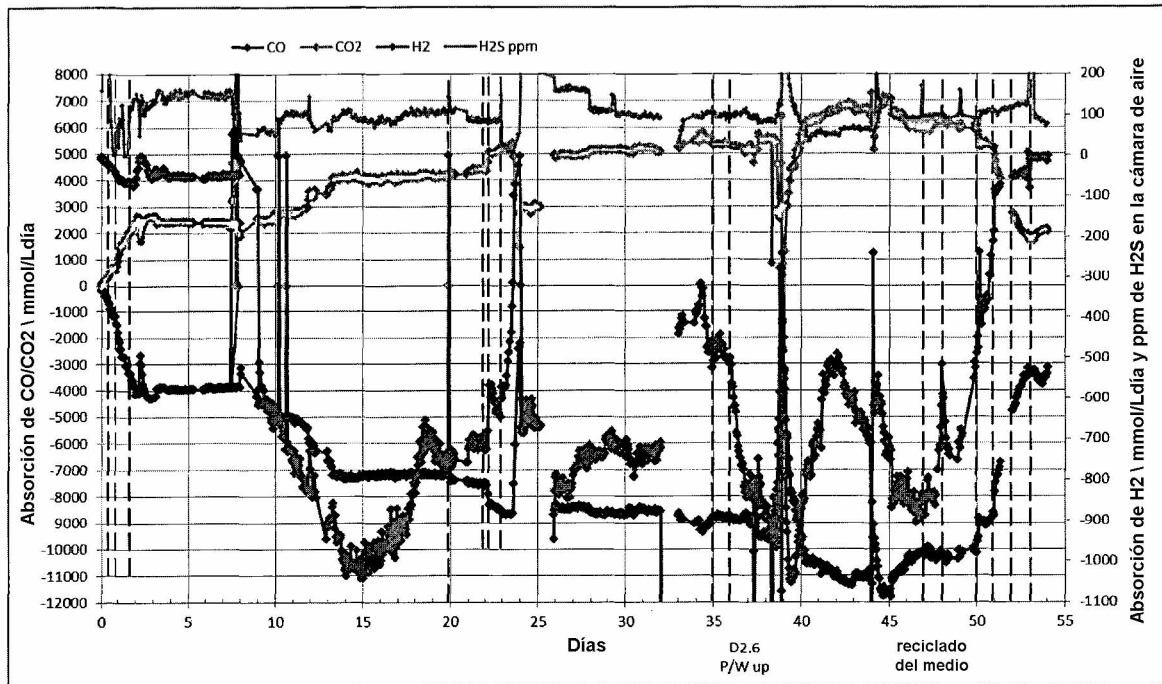


Fig. 3

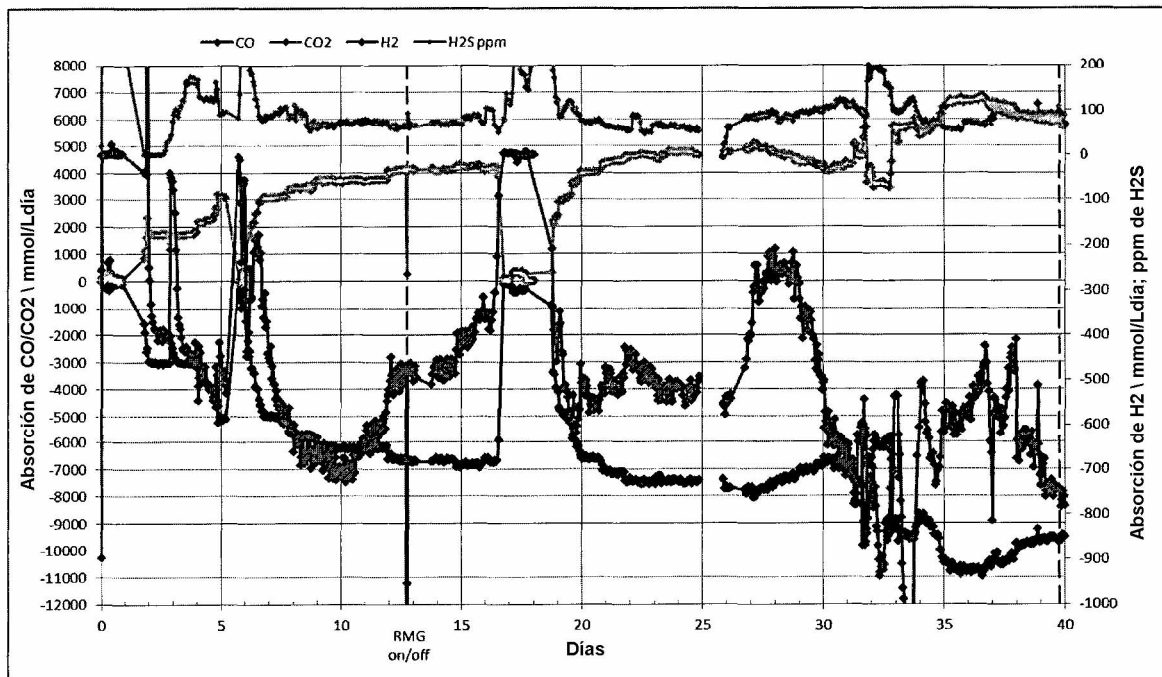


Fig. 4

Nombre	Nº de oxidación	Utilizado
H ₂ SO ₄	+6	No
Na ₂ S ₂ O ₆	+5	No
H ₂ SO ₃	+4	Sí
Na ₂ S ₂ O ₄	+3	Sí
Na ₂ S ₂ O ₃	+2	No
S ₈	0	Sí
RSSR (cisteína)	-1	No
Na ₂ S/NaHS/cisteína	-2	Sí

Tabla 1

Día	mL de (NH ₄) ₂ SO ₃ 0,12M / L de medio	mmol de (NH ₄) ₂ SO ₃	Tasa de dilución	Absorción de CO (mol/L/día)	Biomasa (g/L)	ppm de H ₂ S en la cámara de aire
21	12	1,5	2,06	7,5	5	90
37	22	2,7	2,64	9	8	90
43	29	3,4	2,7	11	8	70

Tabla 2

Día	mL de (NH ₄) ₂ SO ₃ 0,12M / L de medio	mmol de (NH ₄) ₂ SO ₃	Tasa de dilución	Absorción de CO (mol/L/día)	Biomasa (g/L)	ppm de H ₂ S en la cámara de aire
15	10	1,2	2,2	6,8	6,5	80
28	15	1,8	2,8	7,5	8	90

Tabla 3