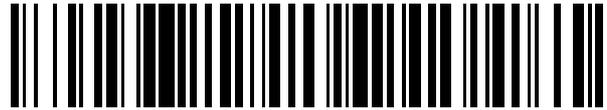


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 563**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/US2012/055612**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13043513**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12834517 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2758540**

54 Título: **Método para controlar la formación de subproductos indeseables causados por organismos contaminantes en la producción de etanol a partir de gas de síntesis**

30 Prioridad:

21.09.2011 US 201113239305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2019

73 Titular/es:

**SYNATA BIO, INC. (100.0%)
4575 Weaver Parkway, Suite 100
Warrenville, IL 60555, US**

72 Inventor/es:

**DATTA, RATHIN;
REEVES, ANDREW y
KLIMAN, LAURA, T.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 715 563 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para controlar la formación de subproductos indeseables causados por organismos contaminantes en la producción de etanol a partir de gas de síntesis.

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere a procesos para la bioconversión anaeróbica, de baja energía de monóxido de carbono e hidrógeno en una corriente de sustrato gaseoso a compuestos de C₂ o C₃ oxigenados como el etanol por contacto con microorganismos en un sistema de fermentación con alta eficiencia de conversión de tanto monóxido de carbono como hidrógeno. El método de esta invención reduce la producción de los oxigenatos de C₄, lo que reduce la producción de subproductos indeseables tales como el ácido butírico, el butanol y otros alcoholes o ácidos orgánicos de cadena más larga que resultan de contaminantes bacterianos en el sistema de fermentación.

10

15

Antecedentes de la invención

La producción de bioetanol para uso como combustible líquido para motores aumenta en todo el mundo. Tales biocombustibles incluyen, por ejemplo, etanol que puede mezclarse con gasolina con una amplia gama de composiciones. Uno de los principales impulsores del bioetanol es su derivación de recursos renovables mediante la tecnología de bioprocesos y fermentación. Convencionalmente, los biocombustibles se fabrican a partir de carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcares y almidones. Por ejemplo, los dos cultivos agrícolas primarios que se usan para la producción de bioetanol convencional son la caña de azúcar (Brasil y otros países tropicales) y el maíz o maíz (Estados Unidos y otros países templados). La disponibilidad de materias primas agrícolas que proporcionan carbohidratos fácilmente fermentables se limita debido a la competencia con la producción de alimentos y piensos, el uso de la tierra cultivable, la disponibilidad de agua, y otros factores. Consecuentemente, las materias primas lignocelulósicas, tales como residuos forestales, árboles de plantaciones, paja, pastos, y otros residuos agrícolas se consideran materias primas para la producción de biocombustibles. A diferencia de la utilización de combustibles fósiles, el bioetanol derivado de tales plantas o incluso de fuentes de desechos municipales proporciona un recurso ambientalmente sostenible para la producción de combustibles líquidos.

20

25

30

Una ruta altamente eficiente para la producción de bioetanol es la gasificación de biomasa u otra materia orgánica en un gas sustrato que comprende CO e/o hidrógeno seguido de la conversión del gas a etanol mediante el uso de microorganismos homoacetogénicos. Los métodos para tal conversión se conocen a partir de las patentes de los EE.UU. US 7,285,402 B2, US 20110059499 A1, US 20090215163 A1, y otras.

35

Típicamente el gas sustrato para las conversiones de monóxido de carbono o hidrógeno se deriva de un gas de síntesis (gas de síntesis) a partir de la gasificación de materiales carbonosos, del reformado de gas natural y/o biogás de fermentado'es o de corrientes de diversos métodos industriales. El sustrato de gas contiene monóxido de carbono, hidrógeno y dióxido de carbono, y generalmente contiene otros componentes tales como vapor de agua, nitrógeno, metano, amoniaco, sulfuro de hidrógeno y lo similar. (Para los fines de la presente descripción, todas las composiciones de gases se informan sobre una base seca a menos que se indique lo contrario o se desprenda del contexto.)

40

La producción de etanol a partir del gas sustrato por estos métodos requiere cantidades significativas de hidrógeno y monóxido de carbono. Por ejemplo, las ecuaciones teóricas para la conversión de monóxido de carbono e hidrógeno a etanol son:

45



50

Como puede verse, la conversión de monóxido de carbono da como resultado la generación de dióxido de carbono. La conversión de hidrógeno implica el consumo de hidrógeno y dióxido de carbono, y esta conversión a veces se denomina conversión H₂/CO₂. Para los fines de la presente descripción, se conoce como la conversión de hidrógeno.

55

Los procesos de fermentación de gas de síntesis sufren de la pobre solubilidad del sustrato de gas, es decir, monóxido de carbono e hidrógeno, en la fase líquida del medio de fermentación. Munasinghe, y otros, en Biomass-derived Syngas Fermentation in Biofuels: Opportunities and Challenges, Biosource Technology, 101 (2010) 5013-5022, resumen los coeficientes volumétricos de transferencia de masa a los medios de fermentación reportados en la literatura para el gas de síntesis y monóxido de carbono en diversas configuraciones de reactor y condiciones hidrodinámicas. Como un resultado los procesos de biofermentación para la producción de etanol requerirán grandes volúmenes de líquido de fermentación. Por ejemplo, las plantas a escala comercial, aquellas con capacidades de producción de 55 millones de galones (= aproximadamente 208 millones de litros) o más, requerirán zonas de fermentación que utilicen recipientes que contengan un millón de galones o más del líquido de fermentación. Además, los procesos de fermentación deberán operarse de manera continua durante largos períodos de tiempo.

65

Para mantener la eficiencia de producción de etanol en tales zonas de fermentación, existe la necesidad de maximizar la producción de productos oxigenados de C₂ al tiempo que minimiza la producción de productos con cadenas de carbono mayores, como C₄, C₆, C₈ y alcoholes o ácidos orgánicos superiores. Los métodos conocidos buscan lograr esta eficiencia mediante el uso de bacterias homoacetogénicas que tienen un grado muy alto de selectividad para la producción de productos de C₂. Por su naturaleza, los organismos homoacetogénicos que convierten el sustrato de gas en etanol no tienen las vías para hacer estos productos de cadena de carbono más largos.

La capacidad de los organismos homoacetogénicos para sobrevivir con medios mínimos en el sustrato de CO y H₂ en condiciones anaeróbicas proporciona una protección contra muchos contaminantes biológicos que requieren ambientes muy diferentes. Sin embargo, el tamaño y la escala de las zonas de fermentación y las instalaciones generales necesarias para la producción de etanol sobre una base comercial impiden el funcionamiento axénico de las instalaciones. Como resultado la contaminación microbiana se producirá inevitablemente en algún momento y puede degradar la producción al producir tales subproductos de cadenas mayores que a su vez reducen considerablemente el rendimiento de etanol u otros productos deseables.

Si bien hay muchos contaminantes potenciales, una clase común de contaminantes potenciales producirá ácido butírico, butanol y otros alcoholes o ácidos orgánicos de cadena más larga. Los microorganismos que producen tales compuestos como parte de su metabolismo primario se conocen como butirógenos. Hay muchas clases de butirógenos. Una de las clases principales utiliza carbohidratos y otros compuestos de carbono como aminoácidos, lípidos, etc. Otra clase de butirógenos usa gas de síntesis y otra clase de butirógenos puede utilizar etanol y acetato con las vías de la enzima transferasa. Dado que, por las razones mencionadas anteriormente, no es posible operar axénicamente una fermentación tan grande, todas estas fuentes de contaminación por butirógeno existirán.

Una vez que la contaminación por butirógeno ocurre en un recipiente de fermentación a gran escala puede destruir la viabilidad comercial del proceso al cambiar la conversión de alimentación de los productos deseados y hacer que la recuperación del producto sea poco práctica. El diseño de instalaciones de recuperación de productos para grandes variaciones en la composición y concentración de compuestos líquidos añadiría un costo prohibitivo. El gran volumen del líquido de fermentación y el tiempo para incubar los microorganismos hasta las concentraciones de producción hacen que el lavado y el reinicio de la instalación también sean imprácticos.

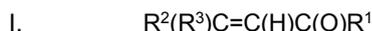
En contraste, las plantas de etanol convencionales, tales como las plantas de etanol de maíz, operan una pluralidad de reactores discontinuos y por lo tanto limitan inherentemente el tiempo que los microorganismos competitivos tienen disponible para el aumento de la población. De hecho, a menudo la duración de las fermentaciones discontinuas se basa en el título de etanol y la concentración de alcoholes superiores, indeseados. Además, los fermentadores pueden esterilizarse entre lotes para eliminar la presencia de microorganismos no deseados.

Por lo tanto se buscan métodos para eliminar o inhibir el crecimiento de butirógenos en una zona de fermentación a gran escala sin interrumpir la producción en curso de etanol u otros productos tales como el ácido acético, propanol, o ácido propiónico de tal zona de fermentación.

Resumen

Por esta invención, se encontró que una cierta clase de compuestos similares a crotonato inhiben el crecimiento de una población de butirógeno mientras que no interrumpe indebidamente la productividad de microorganismos homoacetogénicos o heteroacetogénicos que producen productos de oxigenatos ligeros como etanol, ácido acético, propanol y ácido propiónico. Lograr este descubrimiento requirió la identificación de que estos compuestos actúan como agentes bacteriostáticos o bactericidas para los butirógenos mientras que no inhiben indebidamente el crecimiento de los homoacetógenos. Si el compuesto actúa como un bactericida o agente bacteriostático, su capacidad para actuar *en vivo* es igualmente importante por su efectividad para preservar la producción de los productos deseados en una zona de fermentación a gran escala operada de forma continua durante largos períodos de tiempo. Se descubrió que la clase de compuestos descubierta era efectiva. *en vivo* y, por lo tanto, actuará para inhibir o retardar la contaminación de butirógeno dentro del recipiente de fermentación y puede introducirse como un aditivo en el proceso según sea necesario. Estos compuestos similar a crotonato que actúan de manera bactericida o bacteriostática de esta invención se denominan en la presente memoria como retardantes de butilo.

Los compuestos similar a crotonato eficaces pueden representarse por la fórmula estructural



o



en donde:

R¹ es -OH, -OR⁵, o -N(R⁴)₂, donde R⁵ Es hidrocarbilo, preferentemente, de 1 a 6 carbonos y cada R⁴ pueden ser iguales o diferentes y es hidrógeno o hidrocarbilo de preferentemente, 1 a 6 carbonos;

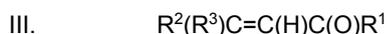
R² es hidrógeno, -NH₂, -OH o -CX₃ en donde cada X puede ser igual o diferente y es hidrógeno o halógeno, preferentemente, perhalogenado y lo más preferentemente, perfluorado;

R³ es hidrocarbilo de 1 a 18 carbonos que puede estar no sustituido o sustituido con -OH, alcoxilo de 1 a aproximadamente 6 carbonos, o halógeno, preferentemente, perhalogenado y con la máxima preferencia, perfluorado;

A es un resto aromático que tiene 5 o 6 átomos en el anillo que pueden ser todos átomos de carbono o pueden ser heterocíclicos con un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en oxígeno y nitrógeno, cuyo resto aromático tiene -R² en la posición 2 donde -R² es como se definió anteriormente y qué resto aromático puede estar no sustituido o sustituido en una o más de las posiciones de carbono más altas (por ejemplo, las posiciones 3, 4, 5 y 6 para un resto fenilo) con (i) hidrocarbilo de 1 a 18 carbonos que pueden estar sustituidos con -OH, alcoxilo de 1 a aproximadamente 6 carbonos, o halógeno, (ii) -OR⁶ en donde R⁶ es alquilo inferior, o (iii) -N (R⁷)₂ en donde cada R⁷ es igual o diferente y es hidrógeno o hidrocarbilo, preferentemente, de 1 a 6 carbonos, o (iv) halógeno, preferentemente, flúor;

con la condición de que en la fórmula estructural I, al menos una, y preferentemente, ambas, de R² y R³ está o está sustituido con haloalquilo y que en la fórmula II al menos la posición del carbono 2 o 3 del resto arilo está sustituida con un grupo de extracción de electrones seleccionado del grupo que consiste en halógeno y haloalquilo. Los grupos hidrocarbilo son preferentemente, grupos alquilo, y lo más preferentemente, alquilos lineales o ramificados.

Los compuestos similar a crotonato preferidos pueden representarse mediante las fórmulas estructurales:



o



en donde:

en la fórmula III, R² es -OH, -NH₂ o -CX₃ en donde X es halógeno, preferentemente, flúor, y R³ es -CX₃ en donde X es halógeno, preferentemente, flúor, y

en la fórmula IV, el arilo es fenilo y al menos uno de los carbonos de posiciones 2 y 3 del resto fenilo es -CX₃ en donde X es halógeno, preferentemente, flúor.

Si bien no se pretende limitarlos, estos compuestos similar a crotonato preferidos comparten no solo configuraciones espaciales similares sino, además, una densidad electrónica reducida en la posición 3 del carbono de las fórmulas I y 2 en el resto arilo en comparación con la de ese carbono del anión crotonato. Los sustituyentes halogenados son de extracción de electrones. La presencia de sustituyentes donadores de electrones tales como amina, hidroxilo o alcoxi, puede moderar el efecto de los sustituyentes de extracción de electrones. Por lo tanto, en modalidades preferidas, cuando está presente un sustituyente donador de electrones, se usa un resto de extracción de electrones fuerte, tal como un perfluoroalquilo.

Una clase de compuestos similares a crotonato son compuestos de crotonato dihalógeno sustituidos (crotonatos que tienen dos grupos metilo perhalogenados terminales). Los compuestos de crotonato dihalógeno sustituidos incluyen ácidos, amidas y ésteres. Compuestos representativos incluyen alquil 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato; ácido 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotónico; 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonamida; alquil 4,4,4-trifluoro-3-(triclorometil)crotonato; ácido 4,4,4-trifluoro-3-(triclorometil)crotónico; 4,4,4-trifluoro-3-(triclorometil)crotonamida; alquil 4,4,4-tricloro-3-(trifluorometil)crotonato; ácido 4,4,4-tricloro-3-(trifluorometil)crotónico; 4,4,4-tricloro-3-(trifluorometil)crotonamida; alquil 4,4,4-tricloro-3-(triclorometil)crotonato; ácido 4,4,4-tricloro-3-(triclorometil)crotónico; 4,4,4-tricloro-3-(triclorometil)crotonamida; alquil 4,4,4-tribromo-3-(trifluorometil)crotonato; ácido 4,4,4-tribromo-3-(trifluorometil)crotónico; 4,4,4-tribromo-3-(trifluorometil)crotonamida; alquil 4,4,4-tribromo-3-(trifluorometil)crotonato; ácido 4,4,4-trifluoro-3-(tribromometil)crotónico; 4,4,4-trifluoro-3-(tribromometil)crotonamida; ácido 4,4,4-tricloro-3-(tribromometil)crotónico; 4,4,4-tricloro-3-(tribromometil)crotonamida; ácido 4,4,4-triyodo-3-(trifluorometil)crotónico; 4,4,4-triyodo-3-(trifluorometil)crotonamida; alquil 4,4,4-triyodo-3-(triclorometil)crotonato; ácido 4,4,4-trifluoro-3-(triyodometil)crotónico; 4,4,4-trifluoro-3-(triyodometil)crotonamida; ácido 4,4,4-tricloro-3-(triyodometil)crotónico y el 4,4,4-tricloro-3-(triyodometil)crotonamida en los que el alquilo es alquilo inferior, preferentemente, de 1 a 4 carbonos, especialmente etilo.

Otra clase de compuestos similares a crotonato son compuestos que contienen fenilo que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-trifluorometilbenzoico; 2-trifluorometilbenzamida; alquil 2-trifluorometilbenzoato; ácido 3-trifluorometilbenzoico; 3-trifluorometilbenzamida; alquil 3-trifluorometilbenzoato; ácido 2-amino-3-trifluorometilbenzoico; 2-amino-3-trifluorometilbenzmidia; alquil 2-amino-3-trifluorometilbenzoato; ácido 3-trifluoro-4-metoxibenzoico; 3-trifluoro-4-metoxibenzamida; alquil 3-trifluoro-4-metoxibenzoato; ácido 3-trifluorometil-4-fluorobenzoico; 3-trifluorometil-4-fluorobenzamida; alquil 3-trifluorometil-4-fluorobenzoato; ácido 3-trifluorometil-5-trifluorometilbenzoico; 3-trifluorometil-5-trifluorometilbenzamida; alquil 3-trifluorometil-5-trifluorometilbenzoato; ácido 2-triclorometilbenzoico; 2-triclorometilbenzamida; alquil 2-triclorometilbenzoato; ácido 3-triclorometilbenzoico; 3-triclorometilbenzamida; alquil 3-triclorometilbenzoato; ácido 2-amino-3-triclorometilbenzoico; 2-amino-3-triclorometilbenzmidia; alquil 2-amino-3-triclorometilbenzoato; ácido 3-tricloro-4-metoxibenzoico; 3-tricloro-4-metoxibenzamida; alquil 3-tricloro-4-metoxibenzoato; ácido 3-triclorometil-4-clorobenzoico; 3-triclorometil-4-clorobenzamida; alquil 3-triclorometil-4-clorobenzoato; ácido 3-triclorometil-5-triclorometilbenzoico; 3-triclorometil-5-triclorometilbenzamida; y alquil 3-triclorometil-5-triclorometilbenzoato donde el alquilo es alquilo inferior, preferentemente, de 1 a 4 carbonos, especialmente etilo.

Otra clase de compuestos similar a crotonato son los crotonatos 3-amino sustituidos tales como el ácido 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotónico; 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonamida; alquil 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonato; ácido 4,4,4-tricloro-3-aminocrotónico; 4,4,4-tricloro-3-aminocrotonamida; alquil 4,4,4-tricloro-3-aminocrotonato; ácido 4,4,4-tribromo-3-aminocrotónico; 4,4,4-tribromo-3-aminocrotonamida; alquil 4,4,4-tribromo-3-aminocrotonato; ácido 4,4,4-triyodo-3-aminocrotónico; 4,4,4-triyodo-3-aminocrotonamida; y alquil 4,4,4-triyodo-3-aminocrotonato en donde el alquilo es alquilo inferior, preferentemente, de 1 a 4 carbonos, especialmente etilo.

El efecto de los compuestos similar a crotonato varía con su concentración. De acuerdo con esta invención los compuestos similar a crotonato serán efectivos en el proceso de fermentación con una concentración del compuesto puro de tan solo 50 ppm en masa para inhibir el crecimiento de los butirógenos. Las concentraciones efectivas pueden reducirse significativamente con el uso de agentes y sistemas de administración que mejoran la distribución en el medio que contiene los microorganismos y mejoran la absorción de los compuestos por parte de los microorganismos. En la mayoría de los casos las concentraciones en exceso de 1000 ppm en masa se evitan para no obstaculizar indebidamente el crecimiento de los microorganismos que producen los oxigenatos ligeros tales como el etanol.

La presente invención se refiere a un método para restringir la producción de oxigenatos C₄ en una fermentación anaeróbica como se define en la reivindicación 1 adjunta. Otros aspectos particulares de la invención se indican a continuación, así como en las reivindicaciones dependientes 2-9.

En un aspecto, el método de la invención es un método para restringir la producción de butirato y butanol y análogos de mayor peso molecular (en adelante, en la presente descripción, colectivamente llamados oxigenatos superiores) en una fermentación anaeróbica de un sustrato de gas que comprende al menos uno de CO y/o una mezcla de CO₂ con hidrógeno. El método pasa la corriente de gas a una zona de fermentación anaeróbica que contiene al menos una especie de microorganismo anaeróbico capaz de producir un producto líquido oxigenado diferente o en adición a oxigenatos superiores. Al menos una porción de la corriente de gas se convierte en el producto líquido por contacto del microorganismo en la zona de fermentación con la corriente de gas. Se adiciona un compuesto similar a crotonato al líquido de fermentación como un retardante butirogénico en una cantidad efectiva para restringir la producción de oxigenatos superiores. El método extrae un líquido de fermentación que contiene el producto líquido de la zona de fermentación y recupera el producto líquido del líquido de fermentación. La zona de fermentación generalmente contendrá múltiples especies de microorganismos, típicamente un microorganismo homoacetogénico para la producción de un producto líquido y un microorganismo butirogénico que produce butirato y/o butanol. La zona de fermentación puede contener, además, microorganismos heteroacetogénicos que producen un butirato o butanol, así como un producto líquido tal como ácido acético y/o etanol o propanol.

En otro aspecto, el método de la invención es un método para producir etanol mediante la fermentación de una corriente de gas que contiene CO y/o una mezcla de CO₂ con hidrógeno mediante el uso de un microorganismo homoacetogénico para convertir la corriente de gas en donde se inhibe la producción de oxigenatos superiores. El método pasa la corriente de gas a una zona de fermentación que contiene un microorganismo homoacetogénico y un líquido de fermentación. El contacto del microorganismo homoacetogénico con la corriente de gas produce etanol en la zona de fermentación. El compuesto similar a crotonato se introduce en el líquido de fermentación en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de los butirógenos y la producción de oxigenatos superiores. La concentración de retardante butirogénico puede oscilar entre 10 y 1000 ppm en masa de forma intermitente o continua. El método extrae el líquido de fermentación que contiene etanol de la zona de fermentación y un producto de etanol se recupera del líquido de fermentación.

En otra forma esta invención es un método para producir etanol mediante la fermentación de una corriente de gas que contiene CO y/o una mezcla de CO₂ con hidrógeno mediante el uso de un microorganismo homoacetogénico para convertir la corriente de gas a etanol. El método pasa la corriente de gas a una zona de fermentación que contiene el microorganismo homoacetogénico y un líquido de fermentación que convierte la corriente de gas en etanol por contacto con el microorganismo homoacetogénico. Un retardante butirogénico que comprende un compuesto similar al crotonato se adiciona a la zona de fermentación para interrumpir el crecimiento de los butirógenos. El retardante butirogénico se adiciona en una cantidad que produce una concentración del compuesto similar a crotonato en un intervalo de entre 50 y 1000 ppm en masa. El método extrae el líquido de fermentación que contiene etanol de la zona de fermentación y un producto de etanol se recupera del líquido de fermentación. En una forma preferida de la invención, el retardante butirogénico comprende al menos uno de 4, 4, 4-trifluoro-3-trifluorometilcrotónico; 4, 4, 4-trifluoro-3-trifluorometilcrotonamida; etil 4, 4, 4-trifluoro-3-trifluorometilcrotonato; ácido 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotónico; 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonamida; etil 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonato; ácido 2-trifluorometilbenzoico; 2-trifluorometilbenzamida; etil 2-trifluorometilbenzoato; ácido 3-trifluorometilbenzoico; 3-trifluorometilbenzamida; etil 3-trifluorometilbenzoato; ácido 2-amino-3-trifluorometilbenzoico; 2-amino-3-trifluorometilbenzamida; y etil 2-amino-3-trifluorometilbenzoato; y el compuesto similar a crotonato se adiciona a la zona de fermentación en una concentración de 50 a 500 ppm en masa.

Aunque los métodos de esta invención proporcionan un valor excepcional en la producción microbiana anaeróbica de oxigenatos ligeros mediante el uso de gas de síntesis, los métodos todavía tienen aplicabilidad a otros procesos para hacer oxigenatos ligeros. Consecuentemente, la presente descripción proporciona, además, en un aspecto amplio (que no forma parte de la invención): un método para restringir la producción de oxigenatos superiores mediante la contaminación de butirógenos en procesos de fermentación al proporcionar una cantidad efectiva de ciertos compuestos

similares al crotonato al líquido de fermentación. En particular, este amplio aspecto se refiere a una mejora en los procesos para la conversión metabólica de sustrato, que puede ser uno o más de azúcar u otro carbohidrato o monóxido de carbono o hidrógeno y dióxido de carbono a oxigenatos ligeros que comprenden el contacto en un líquido de fermentación que contiene dicho sustrato con microorganismos capaces de bioconvertir el sustrato para oxigenatos ligeros en condiciones de fermentación que pueden ser aeróbicas o anaeróbicas, dicho líquido de fermentación es susceptible a la presencia de bacterias contaminantes capaces de producir al menos uno de butirato o butanol de dicho sustrato o de dicha luz se oxigena a través de una enzima butiril CoA, en donde la mejora comprende proporcionar en dicho líquido de fermentación una cantidad suficiente de un compuesto similar al crotonato para restringir la producción de oxigenatos superiores.

10 Figuras

La Figura 1 es un diagrama que ilustra algunos productos de enzimas clave y productos intermediarios en el metabolismo del butirógeno para producir butanol y butirato.

15 La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra la distribución del producto de las fermentaciones con bacterias heteroacetogénicas en presencia de concentraciones variables de un derivado de crotonato.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la concentración de compuestos de acetato y butirato a lo largo del tiempo en un fermentador continuo junto con la densidad óptica del líquido de fermentación.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la producción y la tasa de producción de compuestos de butirato durante un período de tiempo seleccionado de la ejecución continua del fermentador de la Figura 3.

20 La Figura 5 es una porción expandida del gráfico de la Figura 3 entre aproximadamente 500 horas y 640 horas.

La Figura 6 es una porción expandida del gráfico de la Figura 3 entre aproximadamente 1660 horas y 1900 horas.

Descripción detallada

25 *Definiciones*

Los butirógenos se refieren a microorganismos que bajo condiciones anaeróbicas producen compuestos que tienen cuatro átomos de carbono, como butiratos y butanol, y el término puede incluir, además, microorganismos que producen ácidos orgánicos y alcoholes de cadenas más largas ($C_6 - C_8$).

30 El retardante butirogénico se refiere a un compuesto que se usa para inhibir o matar los butirógenos. El término contempla la actividad del compuesto como un bactericida o agente bacteriostático.

35 La impureza de butilo se refiere a cualquier molécula que tenga un total de cuatro o más átomos de carbono en su estructura con los átomos de carbono dispuestos como una cadena.

Los oxigenatos ligeros se refieren a cualquier molécula que tenga dos o tres átomos de carbono y al menos un enlace carbono-oxígeno.

40 Descripción general

Esta invención se aplica a las fermentaciones anaeróbicas para producir oxigenatos ligeros como etanol, ácido acético, propanol y ácido propiónico mediante el uso de un sustrato de gas que comprende monóxido de carbono e hidrógeno, y el gas contendrá típicamente dióxido de carbono y nitrógeno. El gas de síntesis es una fuente de tal sustrato de gas. El gas de síntesis puede fabricarse a partir de muchas materias primas carbonosas. Estas incluyen fuentes de hidrocarburos tales como gas natural, biogás, gas generado mediante el reformado de materiales que contienen hidrocarburos, turba, coque de petróleo y carbón. Otras fuentes para la producción de gas de síntesis incluyen material de desecho tal como escombros de la construcción y demolición, residuos sólidos municipales y gas de vertederos. El gas de síntesis se produce típicamente por un gasificador. La conversión de gas natural a gas de síntesis, por ejemplo, por oxidación parcial es también una fuente atractiva de materia prima de gas de síntesis. Cualquiera de las fuentes de biomasa mencionadas anteriormente son adecuadas para producir gas de síntesis. El gas de síntesis producido de esta manera contendrá típicamente de 10 a 60 % en moles de CO, de 10 a 25 % en moles de CO₂ y de 10 a 60 % en moles de H₂. El gas de síntesis puede contener, además, N₂ y CH₄ así como componentes traza tales como H₂S y COS, NH₃ y HCN. Otras fuentes del sustrato de gas incluyen gases generados por el petróleo y el procesamiento petroquímico. Estos gases pueden tener composiciones sustancialmente diferentes a las de los gases de síntesis típicos, y pueden ser esencialmente hidrógeno puro o monóxido de carbono esencialmente puro. Además, el gas sustrato puede tratarse para eliminar o alterar la composición, lo que incluye, entre otros, la eliminación de componentes por sorción, separación por membrana y reacción selectiva. Pueden adicionarse componentes al sustrato de gas tales como nitrógeno o gases adyuvantes tales como amoníaco y sulfuro de hidrógeno. El término gas de síntesis se usará en la presente descripción y se pretende que incluya estos otros sustratos de gas.

65 Esta invención usará microorganismos homoacetogénicos y condiciones de fermentación particularmente seleccionadas para la producción de oxigenatos ligeros y, preferentemente, seleccionadas para la producción de etanol. Las bioconversiones de CO y H₂/CO₂ a ácido acético y etanol y otros productos se conocen bien. Los microorganismos adecuados viven y crecen en condiciones anaeróbicas, lo que significa que el oxígeno gaseoso y disuelto está esencialmente ausente de la zona de fermentación. Una descripción concisa de las rutas bioquímicas y energéticas para

las bioconversiones acetogénicas se resume en Das, A. y L.G. Ljungdahl, Electron Transport System in Acetogens y por Drake, H.L. y K. Kusel, Diverse Physiologic Potential of Acetogens, que aparecen respectivamente como los Capítulos 14 y 13 de Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria, L.G. Ljungdahl eds., Springer (2003)). Cualquier microorganismo que tenga la capacidad de producir etanol mediante la conversión de los componentes de gas de síntesis: CO, H₂, CO₂ individualmente o en combinación entre sí o con otros componentes que están típicamente presentes en el gas de síntesis pueden utilizarse. Los microorganismos adecuados y/o las condiciones de crecimiento pueden incluir los descritos en la patente de los EE.UU. núm. A 7,704,723 "Isolation and Characterization of Novel Clostridial Species", que describe un cultivo biológicamente puro del microorganismo *Clostridium ragsdalei* que tiene todas las características de identificación de ATCC núm. BAA-622. Puede usarse, por ejemplo, *Clostridium ragsdalei* para fermentar gas de síntesis a etanol.

Los microorganismos adecuados incluyen: *Clostridium Ljungdahlii*, con cepas que tienen las características de identificación de ATCC 49587 (US-A- 5,173,429) y ATCC 55988 y 55989 (US-A- 6,136,577) que permitirán la producción de etanol y ácido acético; *Clostridium autoethanogenum* sp. nov., una bacteria anaeróbica que produce etanol a partir de monóxido de carbono. Jamal Abrini, Henry Naveau, Edomond-Jacques Nyns, Arch Microbiol., 1994, 345-351; Archives of Microbiology 1994, 161: 345-351; y *Clostridium Coskatii* que tiene las características de identificación de ATCC núm. PTA-10522 que se presentaron como la Patente de los EE.UU. núm. 8,143,037.

La invención puede proporcionar beneficios para cualquier tipo de zona de fermentación. Las zonas de fermentación adecuadas suelen denominarse biorreactores. El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías, que incluyen el Reactor de tanque agitado continuo (CSTR), Reactor de células inmovilizadas (ICR), Reactor de lecho de goteo (TBR), Columna de burbujas, Fermentador de levantamiento de gas, Reactor de membrana como el Biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR), Mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido.

Los biorreactores típicos tienen la disposición de un biorreactor de tipo de células en suspensión o un biorreactor con soporte de membrana. En un biorreactor de tipo de células en suspensión, el líquido de fermentación contiene los microorganismos en suspensión a medida que el sustrato de gas pasa a través del líquido de fermentación para efectuar el contacto entre el gas y los microorganismos mediante la absorción del gas en el líquido y la absorción del gas disuelto por el microorganismo. Los biorreactores de células en suspensión típicamente toman la forma de un tanque agitado continuo donde los impulsores proporcionan una mezcla mecánica del sustrato de gas y el líquido de fermentación o un biorreactor de columna de burbuja donde la inyección del sustrato en el gas promueve la mezcla del gas y el líquido.

Un biorreactor con soporte de membrana utiliza una superficie sólida sobre la cual crecen los microorganismos como una biopelícula o una concentración de células con las que el gas sustrato entra en contacto. Un biorreactor de membrana, como se muestra en la patente de los EE.UU. núm. US 20080305539 A1, hace crecer la biopelícula en un lado de la membrana y en contacto directo con el líquido de fermentación, mientras que el gas sustrato penetra en contacto con la biopelícula desde el lado opuesto de la membrana. La patente de los EE.UU. núm. US 20090215163 A1 describe la disposición opuesta para un biorreactor con soporte de membrana donde un lado de la membrana retiene los microorganismos en contacto directo con el sustrato de gas mientras que el líquido de fermentación impregna la parte opuesta de la membrana y entra en contacto con los microorganismos. Cualquiera de los dos tipos de biorreactores con soporte de membrana es adecuado para usar con esta invención.

Cuando se usa la invención con un biorreactor de células en suspensión, el líquido de fermentación incluirá una suspensión de microorganismos y varios suplementos de medios. Los diversos adyuvantes del líquido de fermentación pueden comprender agentes tamponantes, metales traza, vitaminas, sales, etc. Los ajustes en el líquido de fermentación pueden inducir diferentes condiciones en diferentes momentos, como el crecimiento y las condiciones de no crecimiento, que afectarán la productividad de los microorganismos. La patente de los EE.UU. núm. 7,704,723 describe las condiciones y los contenidos del medio de fermentación adecuado para la bioconversión de CO y H₂/CO₂ mediante el uso de microorganismos anaerobios. Otros métodos, condiciones de operación y medios para operar biorreactores para producir etanol se describen en la literatura que incluye los descritos en las patentes núm. WO2007/117157, WO2008/115080, patente de los EE.UU. núm. 6,340,581, patente de los EE.UU. núm. 6,136,577, patente de los EE.UU. núm. 5,593,886, patente de los EE.UU. núm. 5,807,722 y patente de los EE.UU. núm. 5,821,111.

La fermentación se lleva a cabo en condiciones apropiadas que incluyen presión, temperatura, velocidad de flujo del gas, velocidad de flujo del líquido, pH del medio, potencial redox del medio, tasa de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo y concentraciones máximas de sustrato de gas para asegurar que el CO en la fase líquida no sea limitante, y las concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición del producto. Las condiciones adecuadas se describen en las patentes núm. WO02/08438, WO07/117,157 y WO08/115,080. Típicamente, el líquido de fermentación y los microorganismos en la zona de fermentación incluyen una temperatura adecuada en el intervalo de entre 25 °C y 60 °C, y más frecuentemente en el intervalo de aproximadamente 30 °C a 40 °C. Otras condiciones de fermentación incluyen la densidad de los microorganismos, la composición líquida de la fermentación y la profundidad del líquido, que son, preferentemente, suficientes para lograr la conversión buscada de hidrógeno y monóxido de carbono.

Los medios líquidos frescos que contienen nutrientes típicamente entrarán al biorreactor de manera continua. La adición de los medios frescos y la extracción del líquido de fermentación proporcionan una extracción continua de la masa celular

del biorreactor. A medida que la fermentación continúa la generación de masa celular, la velocidad de eliminación y adición del medio y el líquido de fermentación establecerán un tiempo de retención celular promedio en el biorreactor. Los tiempos medios de retención celular para la mayoría de las zonas de fermentación están típicamente en un intervalo de 2 a 7 días.

5 El retardante butirogénico como se describe en esta invención es una clase de compuestos que tiene el efecto de inhibir o detener la producción de ácidos o alcoholes con cuatro o más átomos de carbono de cadena por microorganismos en una zona de fermentación sin interferir sustancialmente con la conversión de gas de síntesis a oxigenatos con un menor número de carbonos tales como ácidos y alcoholes C2 y C3. Los retardantes butirogénicos útiles son cualquier compuesto que pueda interferir con la producción de impurezas butílicas de uno o más butirogénicos. Los butirogénicos conocidos incluyen los butirogénicos estrictos que producen esencialmente solo impurezas de butilo y heteroacetógenos que pueden producir etanol y acetato junto con las impurezas de butilo.

15 Los butirogénicos se caracterizan por tener un paso crítico en su ruta metabólica para la conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA. La Figura 1 muestra las vías generalizadas para el metabolismo del butirogénico y que las vías para la producción de butanol y butirato difieren solo en los sustratos de partida. Los sustratos de partida para la producción de butanol y butirato incluyen etanol y ácido acético a través de la ruta 1, azúcar a través de las rutas 3 y 4 y gas de síntesis a través de la ruta 4.

20 Butirogénicos tales como *C. acetobutylicum*, producen butirato como producto primario o como un conjunto de productos de ácidos grasos de cadena corta como parte de su metabolismo primario en el que se producen, además, varios ácidos y sus correspondientes solventes (Fig. 1, ruta 2). Estos organismos usan azúcares o proteínas como sustratos para la producción de metabolitos. Otros butirogénicos, tales como varias cepas de *Eubacterium* y *Roseburia* son estrictamente butirogénicos y producen grandes cantidades de ácido mediante el uso de una enzima diferente para generar el producto final, el butirato (Fig. 1, ruta 3). Se predice que estas clases de butirogénicos son menos problemáticas que las que usan la ruta 1 y la ruta 4, ya que pueden estar en desventaja metabólica en las condiciones de crecimiento que se prevé que existan en los reactores de gas de síntesis a gran escala.

30 La ruta 1 (Fig. 1) abarca *C. kluyveri* y tipos metabólicos similares de organismos que pueden usar etanol, acetato e hidrógeno para producir ácidos de C₄ y de cadena superior. *C. kluyveri* puede residir en un reactor y formar una relación comensal con otros organismos, lo que potencialmente lo hace metabólicamente ventajoso y puede conducir a infecciones persistentes si las condiciones ambientales del fermentador no se alteran. Así, de los butirogénicos que no usan gas de síntesis, *C. kluyveri* y los tipos similares presentan un alto riesgo de contaminación persistente a largo plazo, ya que pueden producir fácilmente ácidos de C₄ o superiores a partir de etanol y acetato o dos acetatos. Esta reacción también tiene ventajas termodinámicas en ciertas condiciones.

35 Finalmente, los organismos que usan la ruta 4 (Fig. 1) son aquellos que pueden crecer tanto en azúcares como en gas de síntesis y producen una variedad de ácidos y alcoholes de cadena corta y cadena superior. Estos se clasifican ampliamente como los heteroacetógenos y los miembros incluyen *C. carboxidivorans* y *C. drakei*. Estos heteroacetógenos pueden usar tanto azúcares como sustratos de gas de síntesis y también pueden producir ácidos de C₄ y solventes a partir de subunidades C₂. Los heteroacetógenos presentan un riesgo ligeramente mayor que otros butirogénicos, ya que pueden tener ventajas metabólicas en las condiciones de gas de síntesis altamente disuelto, redox bajo, que existirían en una zona de fermentación a gran escala.

45 Al igual que con los butirogénicos estrictos, los heteroacetógenos usan una vía común para generar compuestos C₄. El punto de entrada a la butirogénesis, que es una vía altamente conservada, excepto por algunas reacciones finales entre todos los butirogénicos, se produce cuando dos acetil-CoA se condensan para formar acetoacetil-CoA por una reacción con tiolasa. A esto le sigue una hidroxilación en uno de los carbonilos para formar S3-hidroxi-butil-CoA (Fig. 1). El hidroxi-butil-CoA se deshidrata por la crotonasa para formar crotonil-CoA. La reacción previa para formar 3-HBCoA puede lograrse mediante una variedad de deshidrogenasas y no genera energía para la célula, pero regenera algunos cofactores oxidados. Una vez que se genera el crotonil-CoA la célula se vuelve susceptible a los inhibidores ya que la mayoría, si no toda, de la energía derivada de la butirogénesis proviene de la conversión de la crotonil-CoA en butiril-CoA. Todas estas vías podrían detenerse al interrumpir el paso crítico de convertir el crotonil CoA en butiril CoA.

50 Se encontró que una clase de compuestos similares a crotonato descritos anteriormente actuaría como retardantes de butilo en la producción de oxigenatos ligeros a partir de gas de síntesis. Si bien no se desea limitarse a la teoría, se cree que estos compuestos interrumpen este paso crítico en el metabolismo del butirogénico. Al mismo tiempo, estos compuestos similar a crotonato no interfirieron indebidamente con la producción de oxigenatos ligeros tales como el etanol por un homoacetógeno. Es importante destacar que el efecto perjudicial sobre el butirogénico se produce *in vivo* lo que convierte de esta manera a este retardante en adecuado para uso directo en fermentaciones.

60 Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría, los compuestos similares a crotonato que se usan en esta invención imitan al anión crotonato no sustituido pero se deben a grupos de extracción de electrones que afectan al átomo de carbono de la posición 3 (posición 2 en el resto arilo de fórmula II), y la densidad de electrones reducida interviene en los mecanismos que interrumpen esta etapa.

65

Estos retardantes de butilo a menudo proporcionan resultados deseables a niveles de concentración relativamente bajos. En concentraciones tan bajas como 50 ppm en masa en una fermentación continua, los derivados de crotonato tuvieron efectos beneficiosos en la reducción del butanol y el ácido butírico sin interrumpir indebidamente la producción de ácido acético y etanol. De hecho se descubrió que muchos compuestos similares a crotonato que se usan en el método de esta invención no comienzan a afectar indebidamente el crecimiento del homoacetógeno hasta alcanzar concentraciones de 1000 ppm en masa en el líquido de fermentación. Así, la cantidad de estos compuestos similares a crotonato que se adicionan a la zona de fermentación puede ajustarse para mantenerlos en un intervalo que retardará efectivamente el crecimiento de los butirógenos sin inhibir indebidamente el crecimiento de los homoacetógenos deseados. Como resultado el uso del retardante de butilo puede ajustarse para reducir la producción de impurezas de butilo sin dañar excesivamente la producción de etanol, ácido acético y otros productos de oxigenatos ligeros.

El retardante de butilo puede adicionarse a una zona de fermentación de varias maneras. Puede inyectarse en una dosis deseada directamente en la zona de fermentación. El retardante de butilo puede mezclarse, además, con la entrada de medios frescos o una corriente de reciclaje de la zona de fermentación para promover una mejor mezcla del retardante de butilo en la zona de fermentación.

Estos retardantes de butilo son fácilmente miscibles en hidrocarburos simples y otros solventes no acuosos. Por ejemplo, hidrocarburos aromáticos comunes tales como xilenos, tolueno, etc. o hidrocarburos alifáticos tales como hexano disuelven estos retardantes de butilo. Por lo tanto el retardante de butilo puede disolverse en tales hidrocarburos y otros disolventes no acuosos y convertirse en microemulsiones mediante técnicas bien conocidas mediante la adición de surfactantes y cosolventes adecuados. Estas partículas de microemulsión tienen típicamente un diámetro de 0.1 micrones y pueden dispersarse fácilmente en el medio de fermentación. En el medio de fermentación, las partículas de la emulsión entrarán en contacto con los butirógenos y administrarán los retardantes de butilo a los organismos. La principal ventaja de tal sistema de administración en microemulsión es que son efectivos en dosis mucho más bajas porque pueden proteger los compuestos activos como el retardante de butilo y ayudan, además, a administrar el retardante de butilo a la superficie celular que es el objetivo principal. Los métodos para hacer tales microemulsiones y su uso en formulaciones de biocidas generales se describen en la patente de los EE.UU. 6096225 de Yang y otros. En una fermentación de tipo planctónico o de células en suspensión, el retardante de butilo será efectivo cuando se introduzca como una dosis única en una concentración de 10 a 1000 ppm en masa, con niveles de concentración de 50 a 500 ppm en masa para la mayoría de las aplicaciones. Las concentraciones efectivas se influenciarán por el sistema de administración con sistemas de microemulsión que tengan una concentración efectiva por debajo de 50 ppm de masa y hasta 10 ppm de masa o menos. Preferentemente, cuando se busca el efecto butirogénico de forma continua, estas dosis se calculan en función del tiempo medio de retención celular del biorreactor, de manera que la dosis tendrá una duración de al menos 2 días. Los niveles de dosificación más altos pueden usarse una sola vez para una operación de fermentación en la que la población de butirógenos es indeseablemente alta para llevar a la población a un nivel aceptable de estado estable. Aunque la concentración más alta puede dar como resultado una pérdida de homoacetógenos en la población, los homoacetógenos pueden recuperar rápidamente la densidad celular deseada. Así incluso cuando puede ocurrir alguna pérdida de homoacetógenos, los procesos de esta invención ofrecen un enfoque mucho más viable económicamente para el control de los butirógenos que una limpieza y esterilización del fermentador.

Es posible adicionar los retardantes de butilo en cantidades variadas en respuesta al monitoreo de la producción de impurezas de butilo y de la salida de producto C_2 y realizar ajustes en la adición y concentración en dependencia de la producción de las impurezas de butilo. A este respecto puede adicionarse la cantidad deseada de retardante de butilo para mantener una concentración deseada en una zona de fermentación o en respuesta a la vigilancia de la presencia de contaminación por butirógeno. Así, el retardante de butilo puede usarse de manera continua o intermitente para prevenir o revertir el efecto del crecimiento del butirógeno. Si se desea, el retardante de butilo puede adicionarse al comienzo del proceso de fermentación. De esta manera, el retardante de butilo actúa como una medida profiláctica para evitar que la contaminación de butirógeno se adueñe del fermentador. La adición puede continuar durante todo el proceso de fermentación mediante inyección continua o intermitente del retardante de butilo en la zona de fermentación. En tales casos una dosis de retardante de butilo relativamente baja puede ser eficaz. En particular, pueden usarse dosis intermitentes a un nivel de concentración de 50 ppm en masa o, preferentemente, de 50 a 100 ppm en masa con una frecuencia de 5 a 10 días. En ausencia de recuperación y recirculación del líquido que contiene el retardante de butilo, el retardante de butilo se lavará del fermentador a una velocidad determinada por el tiempo de retención celular promedio.

Independientemente del sistema de administración puede usarse cualquier método para determinar la presencia de butirógenos y la efectividad del retardante de butilo. El monitoreo de la producción del producto para detectar la presencia de impurezas butílicas de la zona de fermentación puede proporcionar una indicación de la contaminación por butirógeno. Preferentemente, el líquido de fermentación se someterá a un muestreo periódico para la detección de impurezas de butilo.

Muy a menudo el retardante de butilo se adiciona en respuesta a la detección de los butirógenos. En este caso el retardante de butilo se adiciona en cantidad suficiente para producir una dosis única en una concentración de 100 a 1000 ppm en masa en el fermentador, se prefiere una dosis en el intervalo de 500 a 1000 ppm en masa. Puede mantenerse una concentración deseada del compuesto similar a crotonato hasta que la presencia de los butirógenos se reduzca a un nivel deseado, como se indica típicamente por la producción de impurezas de butilo de la zona de fermentación. Una vez

que se reducen suficientes butirógenos a un nivel que produce un producto de zona de fermentación aceptable, puede permitirse que el compuesto de crotonato se lave fuera de la zona de fermentación.

El retardante de butilo puede introducirse para lograr una reducción deseada en la cantidad de impurezas de butilo. Idealmente, las impurezas de butilo en el líquido de fermentación se reducen a cero, sin embargo, el líquido de fermentación típicamente contendrá alguna cantidad de contaminación de butilo. En la mayoría de los casos, el retardante de butilo se usará según sea necesario para mantener la concentración de butirato y butanol en el líquido de fermentación que contiene etanol por debajo del 0.1 % y preferentemente, por debajo del 0.01 %.

EJEMPLOS

Ejemplos 1 - 5

Una variedad de compuestos similares a crotonato se probaron para determinar su actividad bactericida o bacteriostática. Los compuestos ensayados se identifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Compuestos de prueba

A. etil 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato	236.12
B. etil-3-amino-4,4,4-trifluorocrotonato	182.14
C. Crotonato de terc-butilo (comparativo)	142.20
D. ácido 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotónico	208.06
E. etil 4,4,4-trifluorocrotonato	168.12
F. etil-2-metil-4,4,4-trifluorocrotonato (comparativo)	197.16
G. ácido 4,4,4-trifluorocrotónico	140.06
H. etil 3-aminocrotonato	129.16

Ejemplo 1

Estos compuestos se probaron primero para determinar su efecto sobre un homoacetógeno conocido. Cada compuesto se probó en una serie de experimentos por lotes para determinar la respuesta de crecimiento de un homoacetógeno a la presencia del compuesto en concentraciones variables. Todos los experimentos por lotes se realizaron al llenar anóxicamente un tubo de Balch con 5 ml de un medio de fermentación que tiene la composición dada en las Tablas 2 y 3. Para acelerar los resultados, estos experimentos por lotes usaron fructosa como fuente de nutrientes de crecimiento para las bacterias. Así, los medios incluían 5 g/L de fructosa.

Tabla 2. Composiciones del medio de fermentación

Componentes	Cantidad por litro
Solución mineral, ver Tabla 3(a)	25 ml
Solución de metal traza, ver Tabla 3(b)	10 ml
Solución de vitaminas, ver Tabla 3(c)	10 ml
Extracto de levadura	0.5 g
Ajustar el pH con NaOH	6.1
Agente reductor, ver Tabla 3(d)	2.5 ml

Tabla 3(a). Solución mineral

ES 2 715 563 T3

Componentes	Concentración (g/L)
NaCl	80
NH ₄ Cl	100
KCl	10
KH ₂ PO ₄	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4

Tabla 3(b). Solución de metales traza

Componentes	Concentración (g/L)
Ácido nitrilotriacético	2.0
Ajustar el pH a 6.0 con KOH	
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.0
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.8
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.02
Na ₂ SeO ₄	0.1
Na ₂ WO ₄	0.2

Tabla 3(c). Solución de vitaminas

Componentes	Concentración (mg/L)
Piridoxina·HCl	10
Tiamina·HCl	5
Riboflavina	5
Pantotenato de calcio	5
Ácido tióctico	5
Ácido p-aminobenzoico	5
Ácido nicotínico	5
Vitamina B12	5
Ácido mercaptoetanosulfónico	5
Biotina	2
Ácido fólico	2

Tabla 3(d). Agente reductor

Componentes	Concentración (g/L)
Cisteína (base libre)	40
Na ₂ S·9H ₂ O	40

5
10

15
20
25

Cada tubo se inoculó con 0.5 ml de la misma cepa del inóculo del cultivo semilla de la bacteria *C. autoethanogenum*. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C. Veintiuna horas después de la inoculación del tubo con la bacteria, los diferentes derivados de crotonato de la Tabla 1 se adicionaron a diferentes tubos en las cantidades indicadas en la Tabla 4. Esto fue en un momento del crecimiento entre la fase temprana y la fase logarítmica media para las bacterias. Se permitió que progresara cada fermentación de las bacterias en el medio a las diferentes concentraciones de derivados de crotonato y se supervisaron para determinar el crecimiento de las bacterias en intervalos de tiempo seleccionados que varían de aproximadamente 20 horas a 190 horas. El crecimiento en los intervalos se midió mediante la lectura de la densidad óptica (OD) del líquido de fermentación. La densidad óptica se midió mediante el uso de un Spectronic Spec 20 (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 600 nm. La OD del cultivo en el tubo de Balch se midió directamente en el tubo mediante el uso del modo de absorbancia en la máquina Spec 20. La máquina se ajustó a cero de absorbancia mediante la medición y ajuste primero de la configuración a cero de absorbancia mediante el uso del medio solo como blanco. Este proceso se repitió en cada punto de tiempo indicado a lo largo del experimento. La capacidad de una fermentación en tubo a una concentración particular de derivado de crotonato para alcanzar una densidad óptica predeterminada se registró en la Tabla 4. La Tabla 4 indica la presencia de crecimiento bacteriano a una OD de aproximadamente 2 o superior con un "+", y a una densidad óptica en un intervalo de 0.5 a 1.5 como "+/-", e indica el fracaso del crecimiento bacteriano a alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.5 como "-".

30

Tabla 4. Valoración de densidad óptica de *C. autoethanogenum* en respuesta a concentraciones variables de crotonato y compuestos similares a crotonato

ppm(m)	0	1	5	10	50	100	500	1000	5000	10000
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-
C	+			+		+	+	+	+	-
D	+			+		+	+	+/-	-	-
E	+			+		+	+	+	-	-
F	+			+		+	+	+	+/-	-
G	+			+		+	+	+/-	-	-
H	+			+		+	+	+	+	+

35
40
45

50

Como lo indica la Tabla 4, las bacterias homoacetogénicas toleraron la presencia de los compuestos de crotonilo ensayados hasta concentraciones de aproximadamente 5000 ppm.
Ejemplo 2

55

Los compuestos A y D se ensayaron nuevamente para determinar su efecto sobre otro homoacetógeno conocido. Cada compuesto se probó en una serie de experimentos por lotes para determinar la respuesta de crecimiento del homoacetógeno a la presencia del compuesto en concentraciones variables. Todos estos experimentos por lotes se realizaron nuevamente al llenar anóxicamente un tubo de Balch con 5 ml de un medio de fermentación que tiene la composición dada en las Tablas 2 y 3. Para acelerar los resultados, estos experimentos por lotes usaron fructosa como fuente de nutrientes de crecimiento para las bacterias. Así, los medios incluían 5 g/L de fructosa.

60
65

Cada tubo se inoculó con 0.5 ml de la misma cepa del inóculo del cultivo semilla de la bacteria *C. coskatii*. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C. Veintiuna horas después de la inoculación del tubo con la bacteria, los diferentes derivados de crotonato de la Tabla 1 se adicionaron a diferentes tubos en las cantidades indicadas en la Tabla 5. Esto fue en un momento de crecimiento entre la fase temprana y la fase logarítmica media para las bacterias. Cada fermentación de las bacterias en el medio a la diferente concentración de derivados de crotonato se dejó progresar y se supervisó para determinar el crecimiento de las bacterias a intervalos seleccionados de tiempo que varían de aproximadamente 20 horas a 50 horas. El crecimiento en los intervalos se determinó mediante la medición de la OD de la manera descrita en el

Ejemplo 1. La capacidad de una fermentación en tubo a una concentración particular de derivado de crotonato para alcanzar una densidad óptica predeterminada se registró en la Tabla 5. La Tabla 5 indica la presencia de crecimiento bacteriano a una OD de aproximadamente 1.6 o superior con un "+". Todas las muestras de *C. Coskatii* alcanzaron una OD relativamente alta después de un tiempo de solo 50 horas.

Tabla 5. Valoración de densidad óptica de *C. coskatii* en respuesta a concentraciones variables de crotonato y compuestos similares a crotonato

ppm(m)	0	100	500	1000
A	+	+	+	+
D	+	+	+	+

Ejemplo 3

Se realizaron experimentos similares para hacer una determinación preliminar de cuál de los compuestos similar a crotonato y crotonato actuaría como retardantes de butirógeno. Para este propósito los compuestos seleccionados se probaron nuevamente en una serie de experimentos por lotes para determinar la respuesta de crecimiento de los butirógenos a la presencia del compuesto en concentraciones variables. Todos los experimentos por lotes se realizaron al llenar anóxicamente un tubo de Balch de 20 ml con 5 ml de un medio de fermentación que tiene la composición dada en las Tablas 2 y 3. Los medios incluían una concentración final de 0.5 v/v de un sustrato de fructosa. Para cada una de las concentraciones de crotonato analizadas, se prepararon tubos de ensayo duplicados.

Cada tubo se inoculó con 0.5 ml de inóculo del cultivo semilla del butirógeno estricto *Clostridium tyrobutyricum*. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C. Veintiuna horas después de la inoculación del tubo con la bacteria, los diferentes compuestos de la Tabla 1 se adicionaron a diferentes tubos en las cantidades indicadas en la Tabla 6. Esto fue en un momento de crecimiento entre la fase temprana y la fase logarítmica media para las bacterias. Cada fermentación de las bacterias en el medio a la diferente concentración de derivados de crotonato se dejó progresar y se supervisó para determinar el crecimiento de las bacterias a intervalos seleccionados de tiempo que varían de aproximadamente 20 horas a 54 horas. El crecimiento en los intervalos se midió mediante la lectura de la densidad óptica (OD) del líquido de fermentación. La densidad óptica se midió como se describe en el Ejemplo 1. La capacidad de una fermentación en tubo a una concentración particular de derivado de crotonato para alcanzar una densidad óptica predeterminada se registró en la Tabla 6. La Tabla 6 indica la presencia de crecimiento bacteriano a una OD de aproximadamente 1.8 o superior con un "+", y a una densidad óptica en un intervalo de 0.7 a 1.5 como "+/-", e indica el fracaso del crecimiento bacteriano en alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.7 como "-".

Tabla 6. Valoración de densidad óptica de *C. tyrobutyricum* en respuesta a concentraciones variables de crotonato y compuestos similares a crotonato

ppm(m)	0	100	500	1000
A	+	+	+/-	-
B	+	+	+	+
C (comp)	+	+	+	+
D	+	+	+	+
E	+	+	+	+
F (comp)	+	+	+	+
G	+	+	+	+

Ejemplo 4

Se realizaron experimentos similares para determinar el efecto de los derivados de crotonato en bacterias heteroacetogénicas. Los derivados de crotonato seleccionados se probaron en una serie de experimentos por lotes para determinar la respuesta de crecimiento de los butirógenos a la presencia de los compuestos en concentraciones variables. Todos los experimentos por lotes se realizaron al llenar anóxicamente un tubo de Balch de 20 ml con 5 ml de un medio de fermentación que tiene la composición dada en las Tablas 2 y 3. Los medios incluían una concentración final de 0.5 v/v de un sustrato de fructosa. Para cada una de las concentraciones de crotonato analizadas, se prepararon tubos de ensayo duplicados.

Cada tubo se inoculó con 0.5 ml de la bacteria heteroacetogénica *Clostridium carboxidivorans*. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C. En un momento 20 horas después de la inoculación de las bacterias se adicionaron diferentes derivados de crotonato de la Tabla 1 a diferentes tubos en las cantidades indicadas en la Tabla 7. Esto fue en un momento de crecimiento entre la fase temprana y la fase logarítmica media. Cada fermentación de las bacterias en el medio a la diferente concentración de derivados de crotonato se dejó progresar y se supervisó para determinar el crecimiento de las bacterias a intervalos seleccionados de tiempo que varían de aproximadamente 20 horas a 54 horas. El crecimiento en los diferentes intervalos se midió mediante la lectura de la densidad óptica (OD) del líquido de fermentación. La densidad óptica se midió como se describe en el Ejemplo 1. La capacidad de una fermentación en tubo a una concentración particular de derivado de crotonato para alcanzar una densidad óptica predeterminada se registró en la Tabla 7. La Tabla 7 indica la presencia de crecimiento bacteriano a una OD de aproximadamente 1.8 con un "+". Para estos experimentos, el +/- indica que un tubo de ensayo duplicado mostró una indicación + y el otro mostró una densidad óptica de menos de 0.5.

Tabla 7. Valoración de la densidad óptica de *C. carboxidivorans* en respuesta a concentraciones variables de crotonato y compuestos similares a crotonato

ppm(m)	0	100	500	1000
A	+	+	+	+
D	+	+	+	+/-

Los perfiles de los productos se determinaron en los cultivos de *C. carboxidivorans* que crecieron en presencia del compuesto A. Se realizó una GC-MSD en cultivos de 54 horas y las distribuciones de los productos se calcularon en base a las áreas resultantes de la salida (ver Fig. 2). En cultivos sin adición del compuesto A, la distribución de los alcoholes y ácidos de C₂, C₄ y C₆ fueron similares en ambas muestras. A medida que aumentó la concentración del compuesto A la cantidad de C₂, particularmente los alcoholes, aumentaron. A 500 y 1000 ppm prácticamente todo el producto observado era el alcohol de C₂. Así, la presencia del compuesto A muestra el efecto inhibitorio sobre la producción de ácido y alcoholes de C₄ y de cadena más larga. Así, tales derivados de crotonato pueden limitar efectivamente la cantidad de acumulación de impurezas butílicas en la zona de fermentación de los heteroacetógenos que pueden competir eficazmente en cultivos de gas de síntesis con bacterias homoacetogénicas.

Ejemplo 5

El compuesto A se probó de nuevo en una serie de experimentos en todos los aspectos iguales a los descritos para el Ejemplo 4, excepto que el compuesto A se adicionó a los tubos de Balch en las cantidades indicadas en la Tabla 7 en un tiempo 5.5 horas después de la inoculación de las bacterias. Esto fue en un momento la fase logarítmica temprana del crecimiento. En este caso, el tubo de Balch que no contenía compuesto A alcanzó una OD de 2 después de 29 horas o menos. Después de aproximadamente 54 horas, las fermentaciones en tubo que recibieron 100 ppm de compuesto A tuvieron un tubo que alcanzó una OD de al menos 2, mientras que el tubo duplicado no alcanzó una OD de 1. Para todos los tubos de fermentación que recibieron 500 y 1000 ppm de compuesto A, la OD no aumentó por encima de aproximadamente 0.5.

Los ejemplos 1-5 mostraron que los compuestos A y D se toleraron por los homoacetógenos a una concentración de hasta 1000 ppm. Ambos compuestos A y D mostraron un efecto de inhibición para reducir el crecimiento del butirógeno. Así, se demostró que estos ácidos y crotonilésteres dihalogenados tienen efectos útiles de inhibición in vivo para reducir las impurezas butílicas en fermentaciones homoacetogénicas para la producción de etanol y ácido acético.

Ejemplos 6 - 10

Se realizaron experimentos adicionales para determinar el efecto de los derivados de crotonilo en fermentaciones continuas que contienen contaminación con butirógeno. Los compuestos A y D se probaron en un fermentador de 2 L que contenía un cultivo semilla de un biorreactor de 10,000 galones (= aproximadamente 37854 litros) usado en una operación de fermentación a gran escala. La corrida de la fermentación a gran escala tenía un volumen de líquido de fermentación de aproximadamente 8,000 galones (= aproximadamente 30283 litros). La fermentación a gran escala se hizo a partir de una inoculación de *Clostridium autoethanogenum* que mostró una presencia significativa de butirógeno por la presencia de compuestos de butilo al 0.5 % en sus productos.

Para iniciar la fermentación de 2 litros, se introdujo un cultivo semilla del fermentador a gran escala en el fermentador de 2 litros y se cultivó en extracto de levadura a una OD mayor que 1, momento en el cual se observó una producción sustancial de butirógenos. El fermentador de 2 litros era un fermentador Sartorius Biostat Serie B que operaba como un tanque de agitación continua con una velocidad de mezclado de 200 rpm. Después de 24 horas de crecimiento inicial una corriente de gas con una composición de 38 % de CO, 38 % de H₂, 15 % de CO₂ y el balance CH₄ se introdujo en el fermentador. La fermentación se realizó a una temperatura de 37 °C, un pH de 5.30 ± 0.05 y contenía aproximadamente 2 litros de medio de fermentación que tienen una composición que se encuentra en la Tabla 8. Se adicionó continuamente

medio de fermentación fresco al fermentador de 2 litros a una velocidad suficiente para establecer un tiempo de retención celular promedio de 5.8 días. Se permitió que la fermentación progresara y se adicionaron diferentes concentraciones de los compuestos A y D a la fermentación como inyecciones intermitentes en diferentes momentos. Se dejó que cada inyección se lavara del fermentador antes de la siguiente inyección. La presencia de compuestos de acetato y butirato en el fermentador junto con la OD de los medios de fermentación se muestra en la Figura 3.

Tabla 8. Composición del medio de fermentación de 2 litros

Componentes	Cantidad por litro
Solución mineral, ver Tabla 7(a)	25 ml
Solución de metal traza, ver Tabla 7(b)	10 ml
Solución de vitaminas, ver Tabla 7(c)	10 ml
Extracto de levadura	0 g
Ajustar el pH con NaOH	6.1
Agente reductor, ver Tabla 2(d)	2.5 ml

Tabla 7(a). Solución mineral

Componentes	Concentración (g/L)
NaCl	0
NH ₄ Cl	100
KCl	10
KH ₂ PO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2

Tabla 7(b). Solución de metales traza

Componentes	Concentración (g/L)
Ácido nitrilotriacético	0
pH 2.0 con HCL 12.1 N	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.377
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.358
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.96
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.078
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0
Na ₂ SeO ₄	0.1
Na ₂ WO ₄	0.118
Fe(SO ₄)·7H ₂ O	3.657
pH 2.0 con HCL 12.1 N	

Tabla 7(c). Solución de vitaminas

Componentes	Concentración (mg/L)
Piridoxina·HCl	0
Tiamina·HCl	10
Riboflavina	0
Pantotenato de calcio	10
Ácido tióctico	0
Ácido p-aminobenzoico	0
Ácido nicotínico	0.5
Vitamina B12	0
Ácido mercaptoetanosulfónico	0
Biotina	5
Ácido fólico	0

Tabla 7(d). Agente reductor

Componentes	Concentración (g/L)
Cisteína (base libre)	40
Na ₂ S·9H ₂ O	0
Antiespumante Clerol	0.02

Ejemplo 6

Después de aproximadamente 500 horas de operación del fermentador, el compuesto A se adicionó directamente al fermentador a una concentración de 500 ppm cuando la OD fue de 1.82 y la concentración de butirato fue de 4.5 g/L. Tras la introducción del compuesto, la OD disminuyó rápidamente en casi un 50 % en las primeras 24 horas y la concentración de butirato disminuyó en un 20 % en el mismo período de tiempo. Además, en las primeras 24 horas el contenido de butanol aumentó rápidamente en 6 veces hasta 0.68 g/L, lo que indica una rápida conversión del ácido butírico en butanol. La tasa de conversión del ácido butírico y la tasa de dilución de los medios se combinaron para disminuir dramáticamente la tasa de producción de butirato hasta que se redujo a cero dentro del intervalo de 80 horas después de la adición inicial del compuesto A. (ver Fig. 4) En adición, la OD continuó su disminución hasta un mínimo de 0.54 después de 80 horas. Aproximadamente 140 horas después de la adición de 500 ppm del compuesto A, la OD casi se recuperó a su nivel original con un aumento en el etanol de más del 100 % y un aumento dramático en la producción de ácido acético. (ver Fig. 5) La concentración de los ácidos y alcoholes de C₂ y C₄ se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9.

Adición	OD	Etanol	Ácido acético	n-Butanol	Ácido butírico
h	@600 nm	g/L	g/L	g/L	g/L
0.0	1.82	0.026	3.237	0.109	4.503
24.0	1.09	0.266	2.728	0.681	3.600
49.0	0.76	0.255	2.333	0.601	3.074
80.0	0.54	0.212	1.959	0.497	2.542
121.0	0.75	0.345	2.446	0.513	1.842
145.0	1.17	0.441	4.082	0.311	1.645

Ejemplo 7

Después de aproximadamente 700 horas de operación del fermentador y del lavado de la primera adición de 500 ppm del compuesto A, se adicionaron otras 50 ppm de compuesto A directamente en el fermentador. Una disminución en la OD y en la concentración de butirato (ver Fig. 3) siguió a la adición de 50 ppm y continuó durante al menos los primeros 3 días. Al mismo tiempo, hubo un aumento continuo en la concentración de etanol y ácido acético.

Ejemplo 8

Después de aproximadamente otros 8 días y del lavado de la adición de 50 ppm del compuesto A, la concentración de butirato aumentó a 2 g/L. En este momento se adicionaron otras 100 ppm de compuesto A directamente en el fermentador a aproximadamente 890 horas en la ejecución. Tras la adición del compuesto A, la concentración de etanol comenzó a aumentar inmediatamente. Después de aproximadamente 24 horas, la concentración de butirato comenzó a disminuir nuevamente y disminuyó casi un 50 % durante los siguientes 4 días. (ver Fig. 3)

Los resultados de los Ejemplos 5-8 muestran que en un reactor butirogénico de 2 L el compuesto A tenía un efecto inhibitorio y bactericida en la población de butirógeno poco después de la adición. En los tres ensayos, la adición del compuesto A mostró una disminución en las primeras 24 horas en la OD y en la producción de butirato con un aumento en la producción de C₂. La adición del retardante de butirógeno demostró tener efectos beneficiosos en concentraciones tan bajas como 50 ppm.

Ejemplo 9

La operación del fermentador continuó en las mismas condiciones operativas después de la adición de 100 ppm del compuesto A. Después de dejar 20 días para el lavado completo del compuesto A, se adicionaron 100 ppm de compuesto D directamente en el fermentador a aproximadamente 1370 horas en la ejecución del fermentador. Tras la adición del compuesto D, hubo un fuerte aumento en la concentración de etanol y la concentración de ácido acético acompañada por una disminución en la producción de butirato. La concentración de butanol aumentó temporalmente después de la adición de 100 ppm del compuesto D que de nuevo se cree que muestra una rápida conversión del ácido butírico en butanol como se vio en el Ejemplo 5.

Ejemplo 10

Durante 12 días después de la primera inyección del compuesto D en el fermentador, se dejó que el fermentador lavara el compuesto D. Después, se inyectaron 500 ppm de compuesto D directamente en el fermentador después de aproximadamente 1660 horas de operación del fermentador. (ver Fig. 3) Las concentraciones resultantes de los ácidos y alcoholes de C₂ y C₄ a partir del momento de adicionar las 500 ppm de compuesto D se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10.

H de adición	OD @600nm	EtOH g/L	Ácido acético g/L	n-Butanol g/L	Ácido butírico g/L
0	1.40	0.55	8.72	0.21	1.51
30	1.35	0.61	8.48	0.23	1.47
49	1.23	0.69	8.64	0.26	1.44
73	1.12	0.68	8.56	0.26	1.37
123	0.92	0.53	8.72	0.19	1.41
145	1.12	0.88	8.75	0.26	1.36
168	1.38	0.95	8.83	0.28	1.11
193	1.18	0.87	8.86	0.24	1.12
217	1.24	0.84	9.05	0.21	1.13
240	1.25	0.82	9.21	0.21	1.17

Los datos y la Figura 6 muestran que inmediatamente después de la adición del compuesto D, la OD comenzó a disminuir lo que muestra una reducción del crecimiento celular. Además, las concentraciones de n-butorato y n-butanol comenzaron a nivelarse y disminuyeron lentamente mientras que las concentraciones de etanol y acetato comenzaron a aumentar. Más aun, después de la disminución inicial, la OD comenzó a aumentar con el aumento concomitante de los compuestos C₂. Esto estableció claramente que los butirógenos se inhibieron específicamente mientras que los organismos

homoacetogénicos no se inhibieron y fueron capaces de crecer y continuar la producción de los productos C₂ deseables en presencia del compuesto D.

Ejemplo 11

Lehman, y otros, en *An Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Assay Utilizing the Ferricenium Ion*, *Analytical Biochemistry* 186, páginas 280 - 284 (1990), describen una técnica de cribado mediante un ensayo *in vitro* para las acil-CoA deshidrogenasas para determinar las deficiencias enzimáticas en niños. Se exploró una adaptación de esta técnica como un posible método de detección para determinar los posibles inhibidores del butirógeno.

Se prepara un licor de ensayo acuoso de manera que cada muestra de 1 mililitro contenga 50 mM de tampón TrisHCl (pH 7.6); 0.05 mM de butiril-CoA; 5 micromoles de FAD (dinucleótido de flavin adenina) y 0.4 mM de ferrocenio. Células enteras de *C. tyrobutyricum* se lisan y se adicionan al licor de ensayo. Se adicionan varios compuestos a las muestras de 1 mililitro a concentraciones de 0.5 mM, 1.25 mM, 2.5 mM, 5.0 mM y 10 mM (se prepara, además, una muestra de control que no contiene extracto libre de células). La abreviatura mM significa milimolar.

Para asegurar la consistencia metabólica entre las muestras, un lote maestro de *C. tyrobutyricum* se prepara y se recolecta en la etapa temprana de crecimiento logarítmico (OD aproximada de entre aproximadamente 0.5 y 0.7). El caldo de fermentación del lote maestro se centrifuga y se enjuaga con tampón TrisHCl 50 mM (pH 7.6), se centrifuga y se reconstituye con tampón TrisHCl 50 mM (pH 7.6) para ser 10 veces más concentrado que el lote maestro original. Se colocan alícuotas de aproximadamente 0.5 mililitros en viales criogénicos (aproximadamente 1.8 mililitros de capacidad) y se congelan a -80 °C hasta que se necesitan. Cuando sea necesario, se coloca un vial en una cámara anóxica de Coy y se deja descongelar a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, las células se adicionan a un tubo de centrifuga de 15 mL y se diluyen con 0.5 mL de una solución de 2 mg/mL de lisozima (adquirida de Aldrich) en Tris-HCl 50 mM (la concentración final de lisozima es de aproximadamente 1 mg/mL). El tubo de la centrifuga se invierte 5 veces, se retira de la cámara de Coy y se deja incubar a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, el tubo de centrifuga se devuelve a la cámara de Coy y se adicionan 50 µL de una solución al 5 % (v/v) de Triton-X 100 en tampón Tris-HCl 50 mM a las células lisadas. El tubo de la centrifuga se agita en vórtex en la cámara de Coy durante aproximadamente 30 segundos, se retira de la cámara y se centrifuga durante 15 minutos a 4000 rpm y 4 °C. El tubo se devuelve a la cámara y el extracto sin células (sobrenadante) se usa para preparar las muestras descritas anteriormente.

Las muestras se analizan en diversos momentos mediante espectroscopia de absorbancia a 300 nm mediante el uso de un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 300 UV/Vis con un carrusel de 7 cubetas y cubetas de cuarzo Starna con un tapón de septo para determinar la cantidad de reducción de ferrocenio. La muestra está a temperatura de laboratorio y se mantiene bajo condiciones anaeróbicas. Típicamente, la absorbancia se mide durante un período de aproximadamente 10 a 20 minutos que es tiempo suficiente para que la absorbancia deje de cambiar. Una pendiente lineal de la tasa de cambio en la absorbancia durante el período en que la absorbancia cambia se determina mediante el uso de la regresión lineal de Microsoft Excel® 2010 para generar una línea recta desde los puntos de datos. Cuanto más gradual sea la pendiente, mejor será la inhibición porque la enzima es más lenta para reducir el ferrocenio en la muestra de ensayo. Después se determina una curva de dosis respuesta para cada compuesto al trazar la pendiente lineal contra la concentración del compuesto respectivo. Después, se determina una pendiente lineal para cada compuesto mediante el uso de una regresión lineal en Microsoft Excel® 2010 para generar una línea recta desde los puntos de datos. Cuanto más pronunciada sea la pendiente de la dosis respuesta, mejor será la inhibición ya que el aumento de la concentración del compuesto provoca una mayor diferencia en la actividad de la enzima. La pendiente dosis respuesta generalmente tiene un amplio estándar de desviación debido a la imprecisión experimental y a las determinaciones de la pendiente.

El compuesto A de la Tabla 1 tiene una pendiente de dosis respuesta de aproximadamente 8 lo que confirma que esta técnica tiene viabilidad para el cribado *in vitro*. La Tabla 11 proporciona las determinaciones de la pendiente dosis respuesta para una variedad de compuestos.

Tabla 11. Pendiente dosis-respuesta para varios compuestos

Compuesto	Pendiente dosis-respuesta
Etil 3-amino-4,4,4-trifluorocrotonato	25
3-Trifluorometil-4-metoxibenzamida	12
Etil 3-trifluorometilbenzoato	9
Etil 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato	8
4,4,4-Trifluorocrotonamida	8
Etil 2-(trifluorometil)benzoato	8

ES 2 715 563 T3

3-(Trifluorometil)benzoato	6
Etil 4,4,4-trifluorocrotonato	6
Crotonato de t-butilo (comparativo)	6
3-Trifluorometil-4-fluorobenzamida	5
Etil 4,4,4-trifluoro-2-metilcrotonato (comparativo)	2

10 Ejemplos del 12 al 15

Los ejemplos 12 a 15 son *en vivo*. Se utilizan ejemplos y medios estándar en cada ejemplo como se describe en las Tablas 12 y 13 (a), (b) y (c).

15 Tabla 12. Composiciones del medio de fermentación

Componentes	Cantidad por litro
Solución mineral, ver Tabla 13(a)	25 ml
Solución de metal traza, ver Tabla 13(b)	2.5 ml
Solución de vitaminas, ver Tabla 13(c)	334 µl
Extracto de levadura	0.5 g
Ajustar pH a 5.8 con NaOH	
Cisteína·HCl·H ₂ O	0.211 g
ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico	20 g

30 Tabla 13(a). Solución mineral

Componentes	Concentración (g/L)
NaCl	0
NH ₄ Cl	100
KCl	10
KH ₂ PO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2

45 Tabla 13(b). Solución de metales traza

Componentes	Concentración (g/L)
Ajustar el pH a 2.0 con HCl	
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.509
FeSO ₄ ·7H ₂ O	14.628
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.434
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.784
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.311
Na ₂ SeO ₄	0.4
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.237
Ajustar el pH a 2.0 con HCl	

Tabla 13(c). Solución de vitaminas

	Componentes	Concentración (mg/L)
5	Piridoxina·HCl	0
	Tiamina·HCl	300
	Riboflavina	0
10	Pantotenato de calcio	300
	Ácido tióctico	0
	Ácido p-aminobenzoico	0
15	Ácido nicotínico	15
	Vitamina B12	0
	Ácido mercaptoetanosulfónico	0
20	Biotina	150
	Ácido fólico	0

Ejemplo 12

25

El etil 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonato se evalúa en una serie de fermentaciones discontinuas para determinar la respuesta de crecimiento de los butirógenos a la presencia de este compuesto en concentraciones variables. Las fermentaciones por lotes se realizan al llenar anóxicamente botellas de suero de 100 mL con 20 mL de medio que tiene la composición dada en las Tablas 12 y 13. En las botellas se proporcionan aproximadamente 0.2 mL de una solución al 50 % p/p de fructosa en agua (concentración final de fructosa de aproximadamente 5 g/L).

30

Cada botella se inocula con 2 mL de inóculo del cultivo semilla del butirógeno estricto *Clostridium tyrobutyricum*, que tiene una OD de aproximadamente 0.90 (que en una dilución 10 veces proporciona una OD inicial para la fermentación de aproximadamente 0.09). Las botellas se mantienen a una temperatura de 37 °C. Veinticinco horas después de la inoculación de las botellas con las bacterias, los medios de fermentación tienen densidades ópticas que van desde 0.70-0.85. En este momento el compuesto se adiciona a diferentes botellas como una solución en medios de 100 µL en las cantidades indicadas en la Tabla 14. Las bacterias se encuentran en fase de crecimiento logarítmico medio en el momento de la inoculación. El proceso de fermentación se deja progresar a 37 °C. A intervalos de tiempo seleccionados, el crecimiento bacteriano se mide mediante la lectura de la densidad óptica (OD) del líquido de fermentación. La densidad óptica se mide al recolectar anóxicamente una alícuota de líquido de fermentación y adiccionarla a una cubeta desechable. Las OD que varían entre 0.01 y 0.4 se miden directamente, mientras que las OD mayores a 0.4 se miden después de realizar una dilución 1/10 con agua.

35

40

Tabla 14. Respuesta de OD a las concentraciones de inhibidor que varían

45

Horas	Control	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
22.5	0.76	0.84	0.86	0.80	0.70
28.5	1.82	1.48	1.87	0.93	0.77
43.5	1.67	1.53	1.92	1.00	0.78

50

55

Como puede verse en los datos de la Tabla 14, el control tuvo el mayor aumento en la OD entre las 22.5 y las 28.5 horas, lo que indica que este compuesto similar a crotonato tuvo un efecto inhibitorio sobre el butirógeno.

Ejemplo 13.

60

El etil 3-(trifluorometil)benzoato se evalúa en una serie de fermentaciones por lotes para determinar la respuesta de crecimiento de los butirógenos a la presencia de este compuesto en concentraciones variables. Las fermentaciones por lotes se realizan al llenar anóxicamente botellas de suero de 100 mL con 15 mL de medio que tiene la composición dada en las Tablas 12 y 13. Se proporcionan aproximadamente 0.15 mL de una solución al 50 % p/p de fructosa en agua (concentración final de fructosa de aproximadamente 5 g/L) en las botellas. Se realizan corridas duplicadas para cada concentración.

65

Cada frasco se inocula con 1.5 mL de inóculo de cultivo semilla del estricto butirógeno *Clostridium tyrobutyricum*, que tiene una OD de aproximadamente 0.40 (que en una dilución 10 veces proporciona una OD inicial para la fermentación de aproximadamente 0.04). Las botellas se mantienen a una temperatura de 37 °C. Dos horas después de la inoculación de las botellas con la bacteria, el compuesto se adiciona a diferentes botellas como una solución en 50 µL de N-metilpirrolidona en las cantidades indicadas en la Tabla 15. El proceso de fermentación se deja progresar a 37 °C. A intervalos de tiempo seleccionados, el crecimiento bacteriano se mide mediante la lectura de la densidad óptica (OD) del líquido de fermentación. La densidad óptica se mide al recolectar anóxicamente una alícuota de líquido de fermentación y adicionarla a una cubeta desechable. Las OD que varían entre 0.01 y 0.4 se miden directamente, mientras que las OD mayores a 0.4 se miden después de realizar una dilución 1/10 con agua.

Tabla 15. Respuesta de OD a las concentraciones de inhibidor que varían

Horas	Control A	Control B	500 ppm A	500 ppm B	1000 ppm A	1000 ppm B
0	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
2	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09
3.5	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15
5.25	0.37	0.37	0.21	0.23	0.21	0.22
11	1.73	1.65	0.90	0.89	0.90	0.87
20.5	1.80	1.76	1.53	1.44	1.42	1.37

La concentración de ácido butírico se determina mediante cromatografía de gases para varias de las muestras anteriores en los puntos indicados en el tiempo. La producción de butirato se calcula con base en los cálculos del área del pico generados por el cromatógrafo de gases. A las 11 horas, la concentración de ácido butírico para cada uno de los controles es de aproximadamente 0.95 gramos por litro, y la concentración de ácido butírico para las muestras que contienen 500 ppm del inhibidor es de aproximadamente 0.6 gramos por litro.

Ejemplo 14.

En este ejemplo, el etil 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato y el etil 3-trifluorometil-4-metoxibenzoato se evalúan mediante fermentación discontinua. Las fermentaciones por lotes se realizan al llenar anóxicamente botellas de suero de 100 mL con 15 mL de medio que tiene la composición dada en las Tablas 12 y 13. Se proporcionan aproximadamente 0.15 mL de una solución al 50 % p/p de fructosa en agua (concentración final de fructosa de aproximadamente 5 g/L) en las botellas. Se realizan corridas duplicadas para cada concentración.

Cada frasco se inocula con 1.5 mL de inóculo de cultivo semilla del estricto butirógeno *Clostridium tyrobutyricum*, que tiene una OD de aproximadamente 0.42 (que en una dilución 10 veces proporciona una OD inicial para la fermentación de aproximadamente 0.042). Las botellas se mantienen a una temperatura de 37 °C. Dos horas después de la inoculación de las botellas con la bacteria, el compuesto se adiciona a diferentes botellas como una solución en 50 µL de N-metilpirrolidona en las cantidades indicadas en la Tabla 16 y 17. El proceso de fermentación se deja progresar a 37 °C. A intervalos de tiempo seleccionados, el crecimiento bacteriano se mide mediante la lectura de la densidad óptica (OD) del líquido de fermentación. La densidad óptica se mide al recolectar anóxicamente una alícuota de líquido de fermentación y adicionarla a una cubeta desechable. Las OD que varían entre 0.01 y 0.4 se miden directamente, mientras que las OD mayores a 0.4 se miden después de realizar una dilución 1/10 con agua. Los resultados de las ejecuciones del control A y el control B se repiten en cada tabla.

Tabla 16. Respuesta de OD al 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato de etilo

Horas	Control A	Control B	5 mM A	5 mM B
0	0.42	0.42	0.42	0.42
2	0.11	0.11	0.10	0.10
4.5	0.28	0.27	0.14	0.11
6	0.41	0.13	0.13	0.13
24	1.66	1.63	0.12	0.12

Tabla 17. Respuesta de OD al 3-trifluorometil-4-metoxibenzoato de etilo

Horas	Control A	Control B	5 mM A	5 mM B	10 mM A	10 mM B
0	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
2	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11	0.11
4.5	0.28	0.27	0.20	0.18	0.24	0.23
6	0.41	0.13	0.16	0.10	0.12	0.13
24	1.66	1.63	1.23	0.91	1.22	1.19

La concentración de ácido butírico se determina mediante cromatografía de gases mediante el uso del procedimiento expuesto en el Ejemplo 13. Las Tablas 18 y 19 resumen los resultados con la producción reportada en gramos por litro. El control se reporta solo en la Tabla 18.

Tabla 18. Producción de butirato mediante el uso de etil 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato

Horas	Control A	Control B	5mM A	5 mM B
2	0	0.02	0.03	0
4.5	0.10	0.09	0.04	0.04
6	0.21	0.26	0.06	0.05
24	1.11	1.12	0.10	0.08

Tabla 19. Producción de butirato mediante el uso de etil 3-trifluorometil-4-metoxibenzoato

Horas	5 mM A	5 mM B	10 mM A	10 mM B
2	0.04	0	0.03	0.03
4.5	0.15	0.67	0.69	0.67
6	0.19	0.10	0.11	0.10
24	1.15	0.14	0.19	0.17

Ejemplo 15.

En este ejemplo, varios compuestos similares a crotonato se evalúan en cuanto a su toxicidad para *C. autoethanogenum* por fermentación discontinua mediante el uso de sustrato de gas de síntesis. Las fermentaciones por lotes se realizan al llenar anóxicamente botellas de suero de 100 mL con 10 mL de medio que tiene la composición dada en las Tablas 12 y 13. Se realizan corridas duplicadas para cada concentración. Los compuestos son:

C-1	Etil 4,4,4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato
C-4	4,4,4-Trifluorocrotonamida
C-9	Etil 4,4,4-trifluoro-3-(amino)crotonato
C-18	3 trifluorometil-4-metoxibenzoato.

Cada botella se inocula con 1.0 mL de inóculo de cultivo semilla de un fermentador activo mediante el uso de un sustrato de gas de síntesis y que contiene *Clostridium autoethanogenum*, cuyo inóculo tiene una OD de aproximadamente 4.92 (que en una dilución 10 veces proporciona una OD inicial para la fermentación de aproximadamente 0.49). Las botellas se gasean con gas de síntesis a aproximadamente 100 kilopascales y se mantienen a una temperatura de 37 °C. Las botellas se regasean con gas de síntesis cada 8 a 12 horas. El gas de síntesis tiene la composición aproximada expuesta en los Ejemplos 6 a 10. Veinticuatro horas después de la inoculación de las botellas con la bacteria, los compuestos se adicionan a diferentes botellas como una solución en 50 µL de N-metilpirrolidona en las cantidades indicadas en las Tablas 20 y 21. El proceso de fermentación se deja progresar a 37 °C. A intervalos de tiempo seleccionados, el crecimiento

bacteriano se mide mediante la lectura de la OD del líquido de fermentación mediante el uso de un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 20. La densidad óptica se mide al recolectar anóxicamente una alícuota de líquido de fermentación y adicinarla a una cubeta desechable. Las OD que oscilan entre 0.01 y 0.4 se miden mediante el uso de líquido de fermentación directamente, mientras que las OD mayores a 0.4 se miden después de realizar una dilución 1/10 con agua.

Tabla 20. Respuesta de OD a diversos inhibidores

Horas	Control	C-1 A	C-1 B	C-4 A	C-4 B	C-9 A	C-9 B	C-18 A	C-19 B
0	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
2.5	0.49	0.42	0.46	0.40	0.42	0.40	0.42	0.47	0.41
6.5	0.41	0.42	0.46	0.4	0.43	0.42	0.46	0.44	0.44
24.5	1.29	1.17	1.08	1.03	1.09	1.14	0.97	1.15	1.18
30.5	1.36	1.15	1.22	1.31	1.33	1.28	1.47	1.32	1.28
47.5	1.86	0.66	0.67	1.7	1.64	1.67	2.12	1.73	1.75

La concentración de ácido butírico se determina mediante cromatografía de gases mediante el uso del procedimiento expuesto en el Ejemplo 13. La Tabla 21 resume los resultados con la producción reportada en gramos por litro.

Tabla 21. Respuesta de OD de varios inhibidores en *C.autoethanogenum*

Horas	Control	C-1	C-4	C-9	C-18
0	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
2.5	0.49	0.44	0.41	0.41	0.44
6.5	0.41	0.44	0.42	0.44	0.44
24.5	1.29	1.12	1.06	1.06	1.16
30.5	1.36	1.18	1.32	1.38	1.30
47.5	1.86	0.66	1.67	1.90	1.74
56	1.91	0.58	1.72	1.98	1.88

Reivindicaciones

1. Un método para restringir la producción de oxigenatos C_4 en una fermentación anaeróbica de un sustrato de gas que comprende al menos uno de CO y una mezcla de CO_2 con hidrógeno, el método comprende:
- 5 a. pasar la corriente de gas a una zona de fermentación anaeróbica que contiene al menos una especie de microorganismo anaeróbico capaz de producir un producto líquido que comprende oxigenato de C_2 o C_3 ; en donde dicho microorganismo se selecciona de al menos una especie de microorganismo homoacetogénico o heteroacetogénico;
- 10 b. convertir al menos una porción de la corriente de gas en el producto líquido por contacto del microorganismo en la zona de fermentación con la corriente de gas;
- c. proporcionar al menos un compuesto similar a crotonato en el líquido de fermentación en una cantidad efectiva para restringir la producción de oxigenatos de C_4 , dicho compuesto similar a crotonato representado por la fórmula estructural



o



en donde:

R^1 es -OH, -OR⁵, o -N(R⁴)₂, en donde R⁵ es hidrocarbilo y cada R⁴ puede ser igual o diferente y es hidrógeno o hidrocarbilo;

R^2 es hidrógeno, -NH₂, -OH o -CX₃ en donde cada X puede ser igual o diferente y es hidrógeno o halógeno;

25 R^3 es hidrocarbilo de 1 a 18 carbonos que puede estar no sustituido o sustituido con -OH, alcoxilo de 1 a aproximadamente 6 carbonos, o halógeno;

A es un resto aromático que tiene 5 o 6 átomos en el anillo que pueden ser todos átomos de carbono o pueden ser heterocíclicos con un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en oxígeno y nitrógeno cuyo resto aromático tiene -R² en la posición 2 en donde -R² es como se definió anteriormente y que puede sustituirse o no en una o más de las posiciones de carbono superiores con (i) hidrocarbilo de 1 a 18 carbonos que puede sustituirse con -OH, alcoxilo de 1 a 6 carbonos, o halógeno, (ii) -O⁶ en donde R⁶ es alquilo inferior, (iii)-N(R⁷)₂ en donde cada R⁷ es igual o diferente y es hidrógeno o hidrocarbilo o (iv) halógeno;

30 con la condición de que en la fórmula estructural I, al menos uno de R² y R³ esté o se sustituya con haloalquilo y que en la fórmula II al menos la posición del carbono 2 o 3 del resto arilo se sustituya con un grupo de extracción de electrones seleccionado del grupo que consiste en halógeno y haloalquilo;

35 d. retirar el líquido de fermentación que contiene el producto líquido de la zona de fermentación; y
e. recuperar el producto líquido del líquido de fermentación.

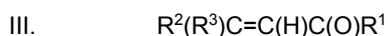
40 2. El método de la reivindicación 1 en donde la zona de fermentación contiene al menos uno de un microorganismo homoacetogénico o heteroacetogénico para la producción de un producto líquido que comprende etanol o acetato y que se contamina con un microorganismo butirogénico que produce al menos uno de butirato o butanol.

45 3. El método de la reivindicación 2 en donde la zona de fermentación contiene un microorganismo homoacetogénico que comprende al menos uno de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* y *Clostridium coskatii* y la zona de fermentación produce un producto líquido que comprende al menos uno de acetato y etanol.

50 4. El método de la reivindicación 1 en donde el microorganismo anaeróbico comprende un heteroacetógeno que produce productos líquidos que tienen 2 a 3 átomos de carbono y el producto líquido comprende al menos uno de ácido acético, etanol, propanol y ácido propiónico.

55 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la zona de fermentación contiene un microorganismo homoacetogénico para la producción de un producto líquido que comprende etanol y un microorganismo butirogénico que produce al menos uno de butirato o butanol.

60 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el compuesto similar a crotonato se representa mediante la fórmula:



o



65

en donde:

en la fórmula III, R² es -OH, -NH₂ o -CX₃ en donde X es halógeno y R³ es -CX₃ en donde X es halógeno, y en la fórmula IV, el arilo es fenilo y al menos uno de los carbonos de posiciones 2 y 3 del resto fenilo es -CX₃ en donde X es halógeno.

5

7. El método de la reivindicación 6 en donde el al menos un compuesto similar a crotonato comprende al menos uno de alquilo 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato; ácido 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotónico; 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonamida; ácido 2-trifluorometilbenzoico; 2-trifluorometilbenzamida; alquil 2-trifluorometilbenzoato; ácido 3-trifluorometilbenzoico; 3-trifluorometilbenzamida; alquil 3-trifluorometilbenzoato; ácido 2-amino-3-trifluorometilbenzoico; 2-amino-3-trifluorometilbenzamida; alquil 2-amino-3-trifluorometilbenzoato; ácido 3-trifluoro-4-metoxibenzoico; 3-trifluoro-4-metoxibenzamida; alquil 3-trifluoro-4-metoxibenzoato; ácido 3-trifluorometil-4-fluorobenzoico; 3-trifluorometil-4-fluorobenzamida; alquil 3-trifluorometil-4-fluorobenzoato; ácido 3-trifluorometil-5-trifluorometilbenzoico; 3-trifluorometil-5-trifluorometilbenzamida; alquil 3-trifluorometil-5-trifluorometilbenzoato; crotonatos 3-amino sustituidos; ácido 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotónico; 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonamida; y alquil 4,4,4-trifluoro-3-aminocrotonato en donde el alquilo es de 1 a 4 carbonos.

10

15

8. El método de la reivindicación 6 en donde el al menos un compuesto similar a crotonato comprende al menos uno de etilo 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonato; ácido 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotónico; 4, 4, 4-trifluoro-3-(trifluorometil)crotonamida; y etil 4,4,4-trifluorometil-3-(trifluorometil) crotonato.

20

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el al menos un compuesto similar a crotonato se adiciona en una cantidad suficiente para producir una concentración de al menos 10 ppm en masa en el líquido de fermentación.

25

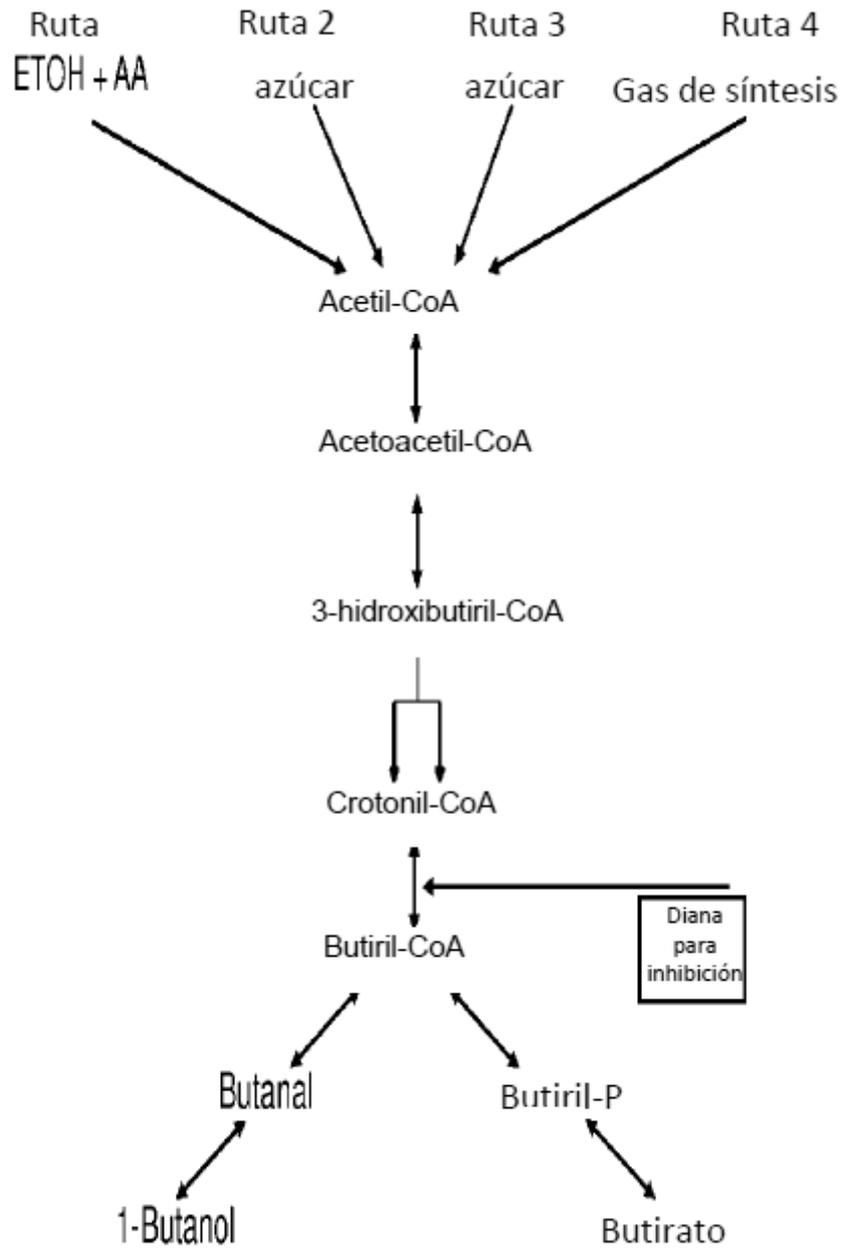


Figura 1

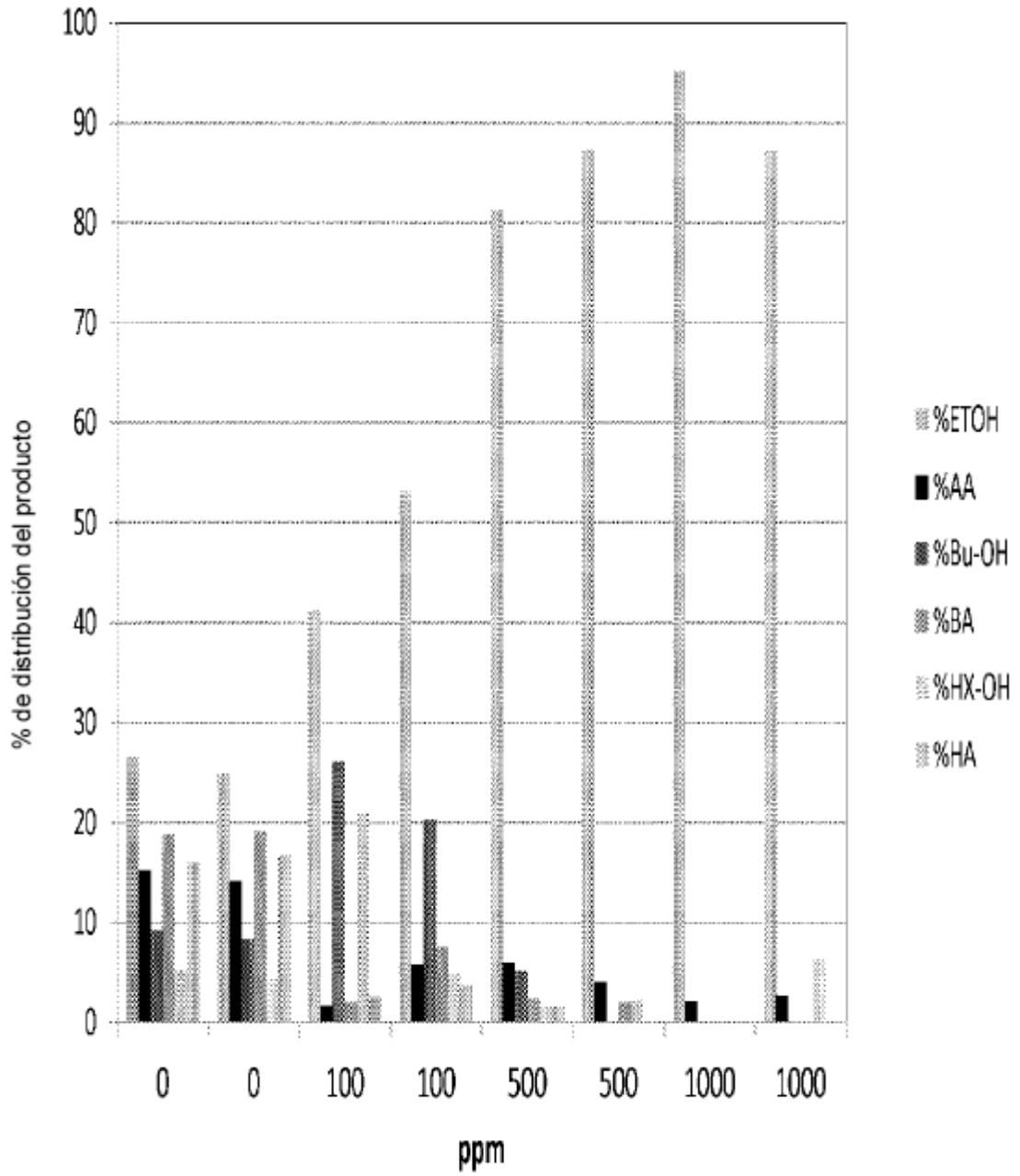


Figura 2

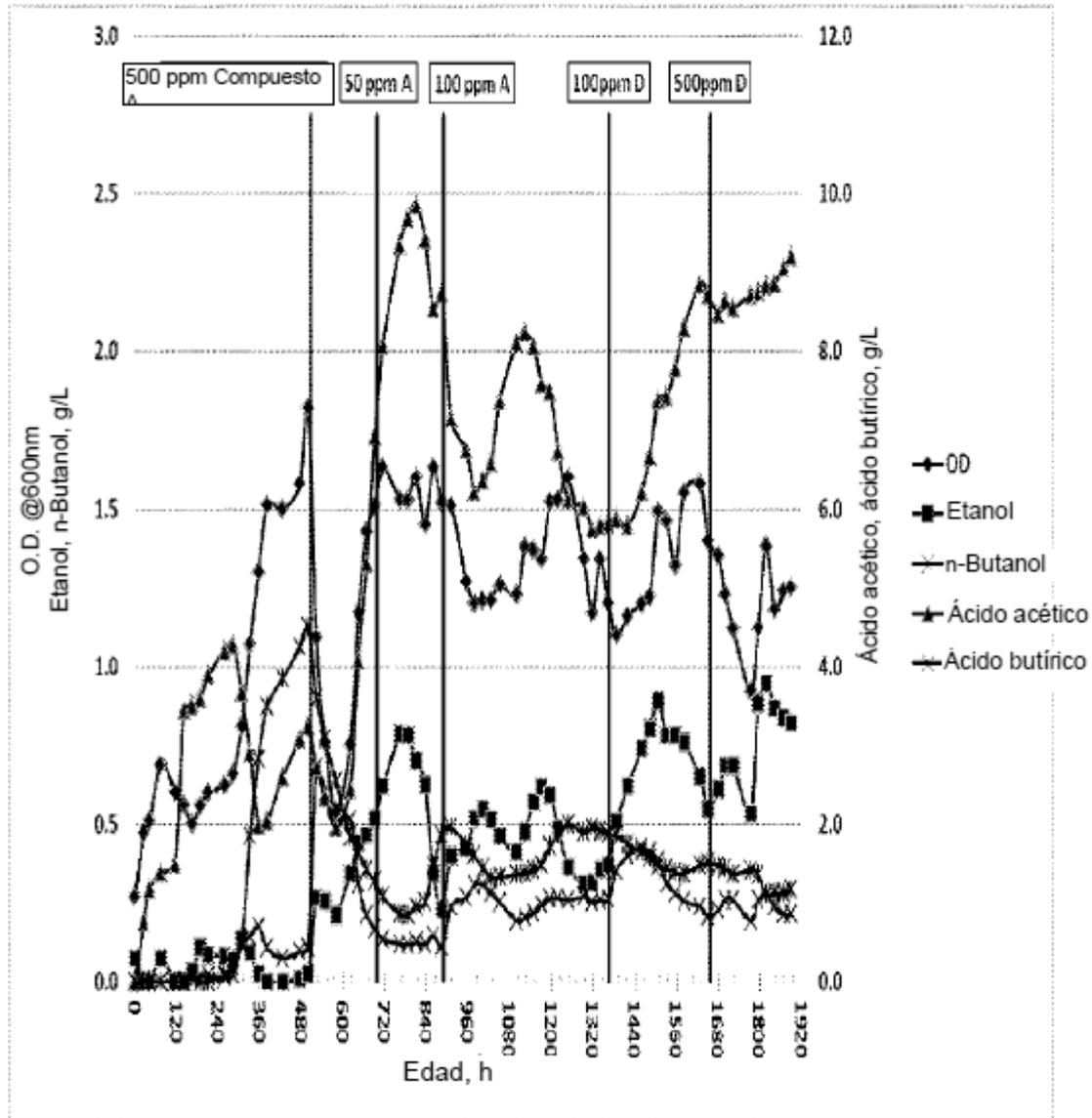


Figura 3

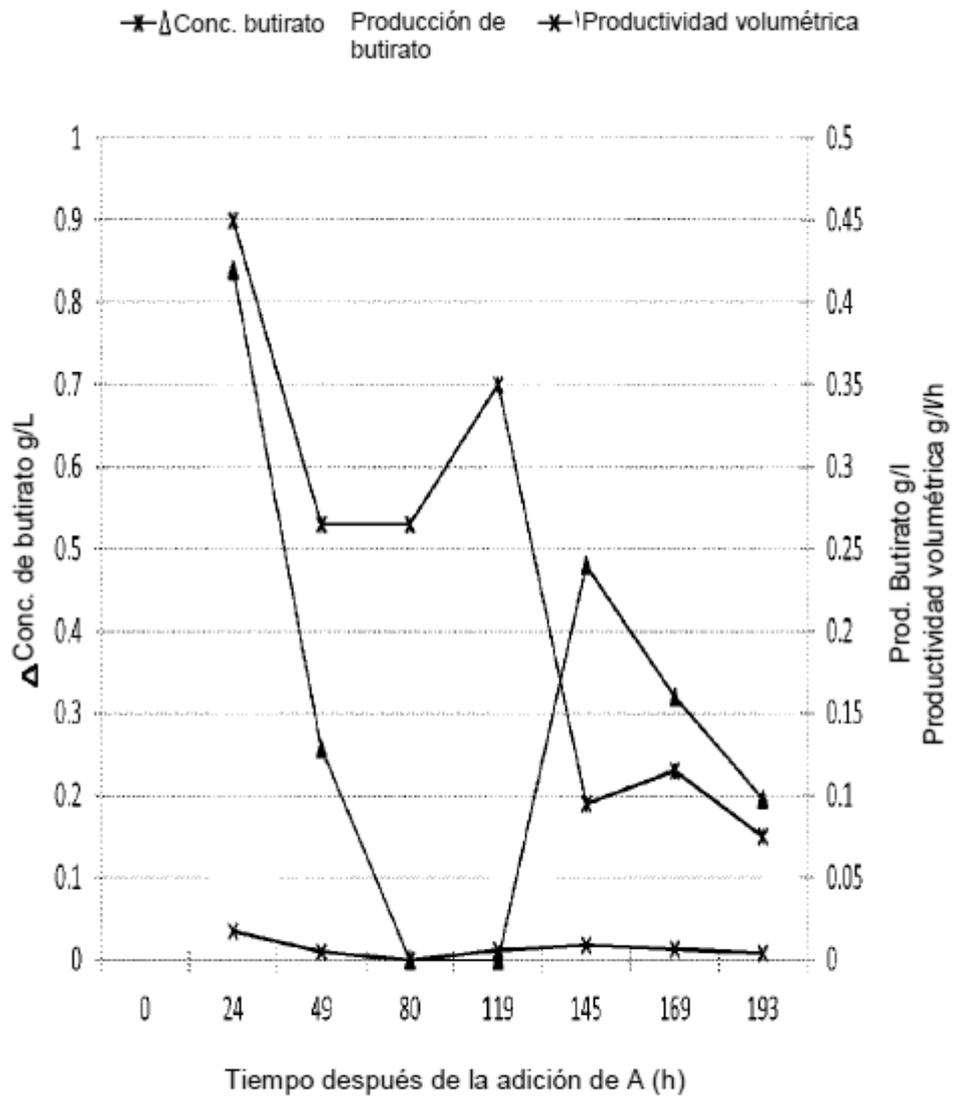


Figura 4

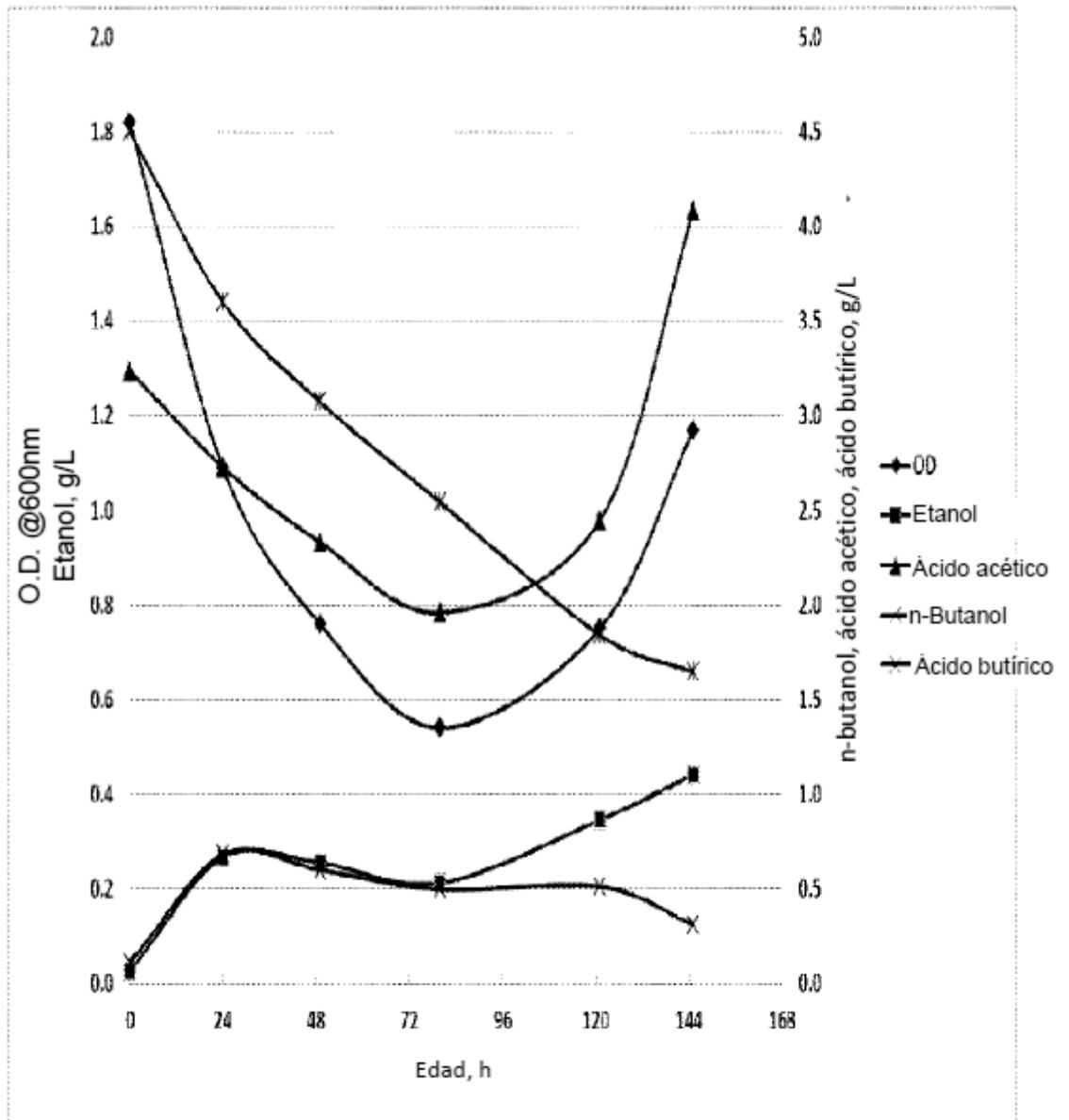


Figura 5

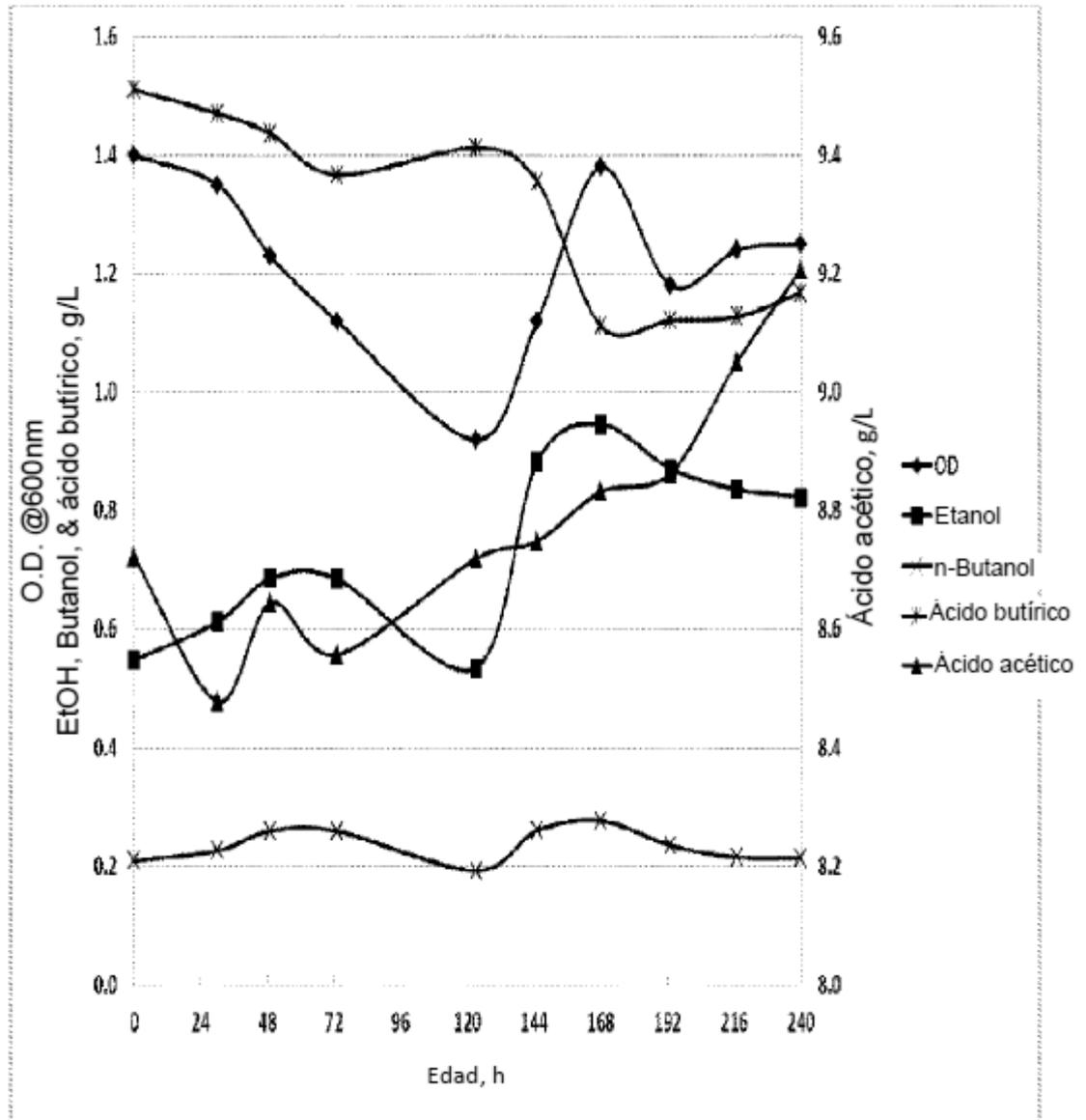


Figura 6