

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 211**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 7/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2014 PCT/US2014/060980**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15058011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2014 E 14853873 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3058080**

54 Título: **Proceso para la captura de carbono en la fermentación de gas**

30 Prioridad:

17.10.2013 US 201361892405 P

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

04.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TIZARD, JOSEPH HENRY y
SECHRIST, PAUL ALVIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 734 211 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

Proceso para la captura de carbono en la fermentación de gas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la fermentación microbiana de gases, particularmente a un proceso para mejorar la captura de carbono en la fermentación anaerobia de sustratos gaseosos.

10 **Antecedentes de la invención**

El etanol se está convirtiendo rápidamente en un combustible de transporte líquido rico en hidrógeno en todo el mundo. El consumo de etanol en 2013 fue de aproximadamente 49,9 millones de m³ (13.180 millones de galones) solo en los EE. UU.. También se pronostica que el mercado global para la industria del etanol combustible crecerá considerablemente en el futuro, debido a un mayor interés en el etanol en Europa, Japón, Estados Unidos y varias naciones en desarrollo.

Por ejemplo, en los EE.UU, el etanol se utiliza para producir E10, una mezcla al 10 % de etanol en gasolina. En las mezclas E10, el componente de etanol actúa como un agente oxigenante, mejorando la eficiencia de la combustión y reduciendo la producción de contaminantes del aire. En Brasil, el etanol satisface aproximadamente el 30 % de la demanda de combustible de transporte, como un agente oxigenante mezclado con gasolina, y como un combustible puro por derecho propio. Asimismo, en Europa, las preocupaciones ambientales que rodean las consecuencias de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) han sido el estímulo para que la Unión Europea (UE) establezca a las naciones miembro un objetivo obligatorio para el consumo de combustibles de transporte sostenibles, tal como etanol derivado de biomasa.

La gran mayoría del etanol combustible se produce mediante procesos de fermentación tradicionales basados en levadura que utilizan carbohidratos derivados de cultivos, tales como la sacarosa extraída de la caña de azúcar o el almidón extraído de los cultivos de cereales, como principal fuente de carbono. Sin embargo, el coste de estas reservas de carbohidratos se ve influenciado por su valor como alimento humano o animal, mientras que el cultivo de almidón o cultivos que producen sacarosa para la producción de etanol no es económicamente sostenible en todas las geografías. Por lo tanto, es interesante desarrollar tecnologías para convertir los recursos de carbono de menor coste y/o más abundantes en etanol combustible.

Los procesos catalíticos se pueden usar para convertir gases que consisten principalmente en CO y/o CO₂ y H₂ en una diversidad de combustibles y productos químicos. También pueden usarse microorganismos para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procesos biológicos, aunque generalmente son más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procesos catalíticos, incluyendo mayor especificidad, mayores rendimientos, menores costes de energía y mayor resistencia al envenenamiento.

La capacidad de los microorganismos para crecer en CO como única fuente de carbono se descubrió por primera vez en 1903. Más tarde se determinó que esta es una propiedad de los organismos que utilizan la ruta bioquímica del crecimiento autótrofo de acetil coenzima A (acetil CoA) (también conocida como la ruta Wood-Ljungdahl y la ruta de monohidruro deshidrogenasa/acetil CoA sintasa (CODH/ACS). Se ha demostrado que un gran número de organismos anaerobios, incluyendo organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos, metabolizan el CO a diversos productos finales, en concreto CO₂, H₂, metano, n-butanol, acetato y etanol. Aunque se usa CO como la única fuente de carbono, todos estos organismos producen al menos dos de estos productos finales.

Se ha demostrado que las bacterias anaerobias, tales como las del género *Clostridium*, producen etanol a partir de CO, CO₂ y H₂ a través de la ruta bioquímica del acetil CoA. Por ejemplo, se describen diversas cepas de *Clostridium ljungdahlii* que producen etanol a partir de gases, en los documentos WO 1998/00558, WO 2000/068407, WO 2002/008438, Patente de EE.UU. 5.173.429, Patente de EE.UU. 5,593,886 y Patente de EE.UU. 6.368.819. También se sabe que la bacteria *Clostridium autoethanogenum* produce etanol a partir de gases (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994)

El documento US 2012/0309066 desvela el hecho de que la relación H₂:CO en el sustrato gaseoso tiene un efecto sobre la eficiencia de la captura de carbono, en donde la presencia de hidrógeno en la corriente de sustrato conduce a una mejora en la eficiencia de la captura de carbono. Se desvela una relación de H₂:CO de 2:1.

Los estudios sobre la fermentación de gas han demostrado que el CO es la fuente de carbono dominante utilizada por los microorganismos carboxidotróficos para la producción de etanol, mientras que el CO₂ es en gran parte no utilizado por los microorganismos. Por consiguiente, existe una gran necesidad de procesos de fermentación de gas mejorados que conviertan incluso una parte del CO₂ en un sustrato gaseoso en productos útiles, tales como alcoholes y/o ácidos.

Sumario de la invención

La invención proporciona un proceso para mejorar la captura de carbono en la fermentación de gas, comprendiendo el proceso proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO, H₂ y CO₂ a un cultivo bacteriano en un medio nutriente líquido y fermentar el cultivo,

5 en donde al menos una parte del CO₂ en el sustrato gaseoso se convierte en uno o más productos por el cultivo, estando el proceso caracterizado por que:

- a. la relación de H₂:CO en el sustrato gaseoso es al menos 5:1,
- b. la relación de CO₂:CO en el sustrato gaseoso está entre 1:1 y 4:1,
- 10 c. la cantidad de CO₂ consumida por el cultivo excede o es igual a la cantidad de CO₂ producida por el cultivo,
- d. la relación de captación específica de H₂:CO por el cultivo es de al menos 1,4:1, y
- e. las bacterias son carboxidotróficas *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*.

En una realización, los productos de fermentación incluyen alcoholes y/o ácidos. En otra realización, los productos comprenden uno o más de etanol, ácido acético (o acetato), 2,3-butanodiol, butanol, isopropanol, lactato, succinato, 15 metil etil cetona (MEK), propanodiol, 2-propanol, acetoína, isobutanol, citramalato, butadieno, ácido poliláctico, isobutileno, 3-hidroxipropionato (3HP), acetona y ácidos grasos.

En otra realización, la captación de CO₂ por el cultivo es de al menos 500 mmol/l/día de CO₂.

20 En otra realización, la cantidad de CO₂ que sale del reactor es al menos un 5 % menor que una cantidad de CO₂ que entra en el reactor.

En una realización adicional, el sustrato gaseoso comprende 30-90 % H₂.

25 Se desvelan bacterias, que puede ser carboxidotróficas, tales como las bacterias derivadas de uno o más de *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*. Por ejemplo, se desvelan bacterias, que puede comprender *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*, tal como *Clostridium autoethanogenum* depositado bajo el número de acceso DSM23693 de DSMZ o bacterias derivadas del mismo.

30 En una realización adicional, el proceso comprende la recuperación de uno o más productos.

Breve descripción de los dibujos

35 La Fig. 1 es un gráfico que muestra los cambios en la captación de CO, CO₂ y H₂ por un cultivo contenido en un primer reactor en respuesta a cambios en la composición del gas de alimentación.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los cambios en la captación de CO, CO₂ y H₂ por un cultivo contenido en un segundo reactor en respuesta a cambios en la composición del gas de alimentación.

40 La Fig. 3 es una gráfica que muestra los cambios en la captación de CO, CO₂ y H₂ por un cultivo contenido en un tercer reactor en respuesta a cambios en la composición del gas de alimentación.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los cambios en la captación de CO, CO₂ y H₂ por un cultivo contenido en un tercer reactor en respuesta a cambios en la composición del gas de alimentación.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el consumo neto de CO₂ por un cultivo.

45 La Fig. 6 es un gráfico que muestra los productos metabólicos de un cultivo de fermentación.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra los efectos de la relación de H₂/CO reaccionado en la producción del producto.

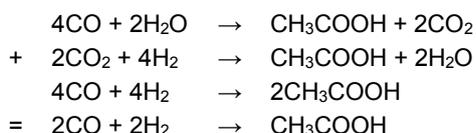
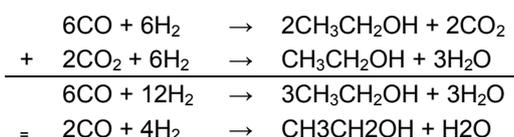
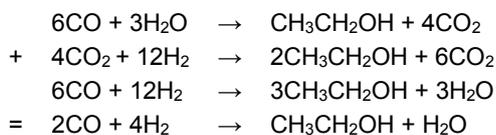
Descripción detallada de la invención

50 Se desvela un proceso para mejorar la captura de carbono en la fermentación de gas proporcionando un sustrato gaseoso que comprende H₂ y CO₂ a un cultivo bacteriano que convierte al menos una parte del CO₂ en el sustrato gaseoso a uno o más productos. Además se desvela un método para producir uno o más productos por fermentación de gas proporcionando un sustrato gaseoso que comprende H₂ y CO₂ a un cultivo bacteriano que convierte al menos una parte del CO₂ en el sustrato gaseoso a uno o más productos.

55 Se ha demostrado que las bacterias anaerobias producen etanol y acetato a partir de H₂ y CO a través de la ruta bioquímica de acetyl-CoA, que puede implicar una serie de reacciones diferentes, dependiendo de las condiciones de reacción y de las concentraciones de sustratos y productos. Por ejemplo, puede producirse acetato a partir de la captación 1:1 de H₂ y CO: $2\text{CO} + 2\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$. El etanol y el CO₂ pueden producirse a partir de la captación 1:1 de H₂ y CO: $3\text{CO} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2$. El etanol puede producirse a partir de la captación 2:1 de H₂ y CO: $2\text{CO} + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$. El acetato puede producirse a partir del consumo de CO sin H₂: $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$. El etanol puede producirse a partir del consumo de CO sin H₂: $6\text{CO} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{CO}_2$.

65 Además, las bacterias anaerobias pueden utilizar CO₂ para producir productos. Por ejemplo, puede formarse acetato a partir de la captación 2:1 de H₂ y CO₂: $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$. El etanol puede formarse a partir de la captación 3:1 de H₂ y CO₂: $2\text{CO}_2 + 6\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 3\text{H}_2\text{O}$.

Pueden combinarse reacciones productoras de CO₂, tales como aquellas que implican la captación específica de CO y H₂, y reacciones de consumo de CO₂ para equilibrar a cero el flujo neto de CO₂:



- 5 En la presente invención, la cantidad de CO₂ consumida por el cultivo excede o es igual a la cantidad de CO₂ producida por el cultivo. En otras palabras, la fermentación puede dar lugar a la captura neta de carbono.

10 El sustrato gaseoso ("gas" o "gas de alimentación" o "gas de fermentación" o "sustrato") puede ser cualquier gas que contenga un compuesto o elemento utilizado por un microorganismo como fuente de carbono y/o energía en la fermentación. El sustrato gaseoso contendrá típicamente una proporción significativa de H₂, CO₂ y/o CO, y pueden contener adicionalmente N₂ u otros gases. En la fermentación anaerobia, el sustrato gaseoso es típicamente libre o sustancialmente libre de O₂.

15 La composición del sustrato gaseoso puede variar. Por ejemplo, las proporciones de H₂, CO₂ y/o CO en el sustrato gaseoso pueden variar. La relación H₂:CO en el sustrato gaseoso es al menos 5:1 o al menos 10:1. El sustrato gaseoso comprende CO y CO₂ a una relación de entre 1:1 y 4:1.

20 El sustrato gaseoso puede comprender o ajustarse para comprender un exceso de H₂. En una realización, el sustrato gaseoso comprende 30-90 % H₂. El sustrato gaseoso puede contener un volumen sustancialmente mayor de H₂ que de CO₂ y CO. Por ejemplo, la relación de H₂:CO₂:CO en el sustrato gaseoso puede ser al menos 5:1:1. Se puede complementar una corriente de gas o una fuente de gas con H₂ (o CO₂ o CO) para obtener un sustrato gaseoso con una composición deseada.

25 El sustrato gaseoso se puede obtener de un proceso industrial. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede ser un gas residual generado por un proceso industrial, tal como la fabricación de productos de metales ferrosos (por ejemplo, la fabricación de acero), fabricación de productos no ferrosos, refinado de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono, producción de amoníaco, producción de metanol, o fabricación de coque. Típicamente, el sustrato gaseoso se deriva de un gas de fabricación de acero.

30 El sustrato gaseoso puede provenir de la gasificación de materia orgánica tal como metano, etano, propano, carbón, gas natural, crudo de petróleo, residuos de bajo valor de la refinería de petróleo (incluyendo coque de petróleo o *petcoque*), residuos sólidos municipales, o biomasa. La biomasa incluye los subproductos obtenidos durante la extracción y el procesamiento de productos alimenticios, tales como el azúcar de la caña de azúcar, el almidón del maíz o los granos o los residuos de biomasa no alimentarios generados por la industria forestal. Cualquiera de estos materiales carbonosos puede gasificarse, es decir, quemarse parcialmente con oxígeno, para producir gas de síntesis (syngas). El gas de síntesis típicamente comprende principalmente CO, H₂, y/o CO₂ y además puede contener cantidades de metano, etileno, etano, u otros gases. Las condiciones operativas del gasificador pueden ajustarse para proporcionar una corriente de sustrato con una composición deseable para la fermentación o combinación con una o más corrientes para proporcionar una composición optimizada o deseable para aumentar la productividad del alcohol y/o la captura general de carbono en un proceso de fermentación.

45 El sustrato gaseoso se puede obtener a partir de un sistema de adsorción por oscilación de presión (PSA). Por ejemplo, un gas de cola de PSA puede contener ~10-12 % del H₂ que entra en el PSA desde un reformador de vapor de metano, además del CO y CO₂ de los reactores de conversión agua-gas en el reformador de vapor de metano. El CO en un gas que sale de un reformador de metano primario (a H₂/CO de aproximadamente 3) se puede hacer reaccionar con agua para formar H₂ y CO₂ utilizando reactores de conversión agua-gas (alta temperatura y baja temperatura). Las condiciones de reacción se pueden adaptar para controlar la cantidad de CO presente en el gas de cola de PSA con respecto a la cantidad de CO₂ presente en el gas de cola de PSA. También puede ser deseable permitir que algo del

H₂ permanezca en el gas de cola de PSA, o para añadir H₂ de nuevo al gas de cola de PSA, para lograr una relación H₂/CO/CO₂ deseable. Típicamente, el PSA fabricará productos de H₂ de muy alta pureza. La recuperación de H₂ se ve afectada principalmente por la relación entre la presión del gas de alimentación y la presión del gas de cola. Hacer circular el gas de cola a la presión mínima da la recuperación más alta de H₂. Dado que el gas de cola generalmente se envía al colector de gas combustible (para ser utilizado en cualquier lugar de la refinería), puede estar a una presión de ~103,4 kPa (15 psig (libras por pulgada cuadrada)). Si se quema en quemadores especializados en el reformador primario, puede estar a una presión tan baja como 34,5 kPa (5 psig). Si se usa gas de cola de PSA como fuente de gas de alimentación para un fermentador, la presión del gas de cola se puede ajustar a 206,8-310,3 kPa (30-45 psig) para evitar la necesidad de compresión de gas.

El sustrato gaseoso puede dirigirse, total o parcialmente, a una fermentación por cualquier medio de conducto adecuado. Por ejemplo, las tuberías u otros medios de transferencia se pueden conectar a la pila de gas residual de una fábrica de acero para desviar al menos una parte del gas residual a un sistema de fermentación. Se pueden usar uno o más ventiladores para desviar al menos una parte del gas residual hacia el sistema de fermentación. Si bien las fábricas de acero pueden adaptarse para producir sustancialmente de manera continua acero (y, posteriormente, gases residuales), los aspectos particulares del proceso pueden ser intermitentes. Típicamente, la descarburación del acero es un proceso discontinuo que dura de varios minutos a varias horas. Un medio de conducto puede adaptarse para desviar al menos una parte del gas residual al sistema de fermentación si se determina que el gas residual tiene una composición deseable.

Puede ser deseable filtrar, frotar o pretratar de otra manera el sustrato gaseoso antes de utilizarlo en la fermentación para eliminar las impurezas o contaminantes químicos o físicos. Por ejemplo, los gases de origen pueden pasar a través del agua o filtrarse de otra manera para eliminar materia en forma de partículas, hidrocarburos de cadena larga, o alquitranes. Sin embargo, dicha filtración o pretratamiento no siempre es necesario. A veces es posible proporcionar un sustrato gaseoso no filtrado y no tratado directamente al cultivo de fermentación.

La composición del sustrato gaseoso puede alterarse para mejorar la eficiencia de la fermentación, la producción del producto y/o la captura general de carbono. En particular, el sustrato gaseoso se puede alterar para que contenga una cantidad mayor o menor de H₂, CO₂ y/o CO combinando o mezclando flujos de dos o más fuentes. Por ejemplo, una corriente que comprende una alta concentración de CO₂, tal como el escape de un convertidor de acero, puede combinarse o mezclarse con una corriente que contiene altas concentraciones de H₂ y CO, tal como la descarga gaseosa de un horno de coque de una fábrica de acero. Alternativa o adicionalmente, una corriente intermitente que comprende CO₂, tal como una corriente de escape de un convertidor de una fábrica de acero, puede combinarse o mezclarse con una corriente sustancialmente continua que comprende CO, CO₂ y H₂, tal como el gas de síntesis producido en un proceso de gasificación. Por ejemplo, una corriente producida por un gasificador se puede aumentar y/o disminuir de acuerdo con la producción intermitente de CO₂ de una fuente industrial a fin de mantener una corriente de sustrato sustancialmente continua con una composición deseable u optimizada.

Las corrientes de sustrato serán típicamente gaseosas, pero también pueden ser líquidas o sólidas. Por ejemplo, el CO₂ puede proporcionarse a un reactor como un líquido o como un líquido saturado de CO₂. A modo de ejemplo, puede usarse un generador de dispersión de microburbujas, como la descrita en Hensirisak, Appl Biochem Biotechnol, 101: 211-227, 2002).

La fermentación de gas es un proceso metabólico mediante el cual se utiliza un sustrato gaseoso como fuente de carbono y/o energía para la producción de etanol u otros productos o productos químicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fermentación" abarca tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del proceso. La fermentación del gas la realiza un microorganismo, típicamente bacterias.

Las bacterias pueden ser cualquier bacteria capaz de fermentar un sustrato gaseoso que comprende H₂, CO₂ y/o CO. Las bacterias pueden ser carboxidotróficas, tales como bacterias derivadas de *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*. Por ejemplo, la bacteria puede ser *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*. Las bacterias también pueden ser una cepa derivada de cualquiera de los géneros o especies mencionados anteriormente.

Las bacterias pueden derivarse del grupo de *clostridios* carboxidotróficos que comprenden la especie *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei*, y aislados relacionados. Estos incluyen, aunque sin limitación, las cepas *C. autoethanogenum* JAI-1T (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETCT (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Int JSyst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (Patente de EE. UU. 5.593.886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (Patente de EE. UU. 6.368.819), *C. ljungdahlii* 0-52 (ATCC 55989) (Patente de EE. UU. 6.368.819), *C. ragsdalei* P11T (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), aislados relacionados tales como "*C. coskatii*" (Publicación de EE. UU. 2011/0229947) y "*Clostridium sp.*" (Berzin, Appl Biochem Biotechnol, 167:

338-347, 2012), o cepas mutadas tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*, Tesis doctoral, Universidad Estatal de Carolina del Norte, 2010). Estas cepas forman un subgrupo dentro del clúster I de ARNr *Clostridial*, y su gen 16S de ARNr es más del 99 % idéntico con un bajo contenido de GC similar de aproximadamente el 30 %. Sin embargo, los experimentos de reasociación de ADN-ADN y de huellas dactilares de ADN mostraron que estas cepas pertenecen a especies distintas (documento WO 2008/028055).

Todas las especies del grupo al que se ha hecho referencia anteriormente tienen una morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico están entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilas (temperatura de crecimiento óptima entre 30-37 °C) y estrictamente anaerobias (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994; Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993; y documento WO 2008/028055). Además, todas ellas comparten los mismos rasgos filogenéticos principales, tales como el mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), un fuerte crecimiento autótrofo en gases que contienen CO con tasas de crecimiento similares y un perfil metabólico similar con etanol y ácido acético como producto final de fermentación principal, y pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formadas en ciertas condiciones (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994; Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011; Tanner, Int JSyst Bacteriol, 43: 232-236, 1993; y documento WO 2008/028055). También se observó la producción de indol con las tres especies. Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización como sustrato de diversos azúcares (por ejemplo, ramnosa, arabinosa), ácidos (por ejemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por ejemplo, arginina, histidina) u otros sustratos (por ejemplo, betaína, butanol). Además, se encontró que algunas de las especies eran auxotróficas de ciertas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina), mientras que otras no lo eran. Se ha encontrado que la organización y el número de genes de la ruta Wood-Ljungdahl, responsable de la captación de gas, es el mismo en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias de aminoácidos y nucleicos (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011). Se ha demostrado asimismo la reducción de los ácidos carboxílicos en sus alcoholes correspondientes en una gama de estos microorganismos (Pérez, Biotechnol Bioeng, 110: 1066-1077, 2012). Por lo tanto, estos rasgos no son específicos de un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino más bien rasgos generales para *Clostridia* carboxidotróficos sintetizadores de etanol, y se puede anticipar que los mecanismos funcionan de manera similar en estas cepas, aunque puede haber diferencias en el rendimiento (Pérez, Biotechnol Bioeng, 110: 1066-1077, 2012).

En la presente invención, las bacterias son *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. Por ejemplo, las bacterias son *Clostridium autoethanogenum* que tienen las características de identificación de las cepas depositadas bajo el número de acceso DSM10061 o DSM23693 del Centro Alemán de Recursos para Materiales Biológicos (DSMZ). O las bacterias son *Clostridium autoethanogenum* depositadas bajo el número de acceso DSMZ DSM10061 o DSM23693 o bacterias derivadas del *Clostridium autoethanogenum* depositadas bajo el número de acceso DSMZ DSM10061 o DSM23693.

La captación ("consumo") y la captación específica ("consumo específico") del sustrato gaseoso por el cultivo bacteriano pueden variar. La captación se describe generalmente en términos de unidad de gas componente (por ejemplo, mmol de H₂, CO₂ o CO) consumido por unidad de caldo de fermentación (por ejemplo, litros de caldo de fermentación) por unidad de tiempo (por ejemplo, días), por ejemplo mmol/l/día. El cultivo puede captar, por ejemplo, al menos 1000 mmol/l/día de H₂, al menos 2000 mmol/l/día de H₂, al menos 4000 mmol/l/día de H₂, o al menos 6.000 mmol/l/día de H₂. En una realización, el cultivo toma al menos 500 mmol/l/día de CO₂, al menos 1000 mmol/l/día de CO₂, al menos 2000 mmol/l/día de CO₂, o al menos 3000 mmol/l/día de CO₂. La captación específica se describe generalmente en términos de unidad de gas componente (por ejemplo, mmol de H₂, CO₂ o CO) consumido por unidad de microorganismo (por ejemplo, gramo de células bacterianas) por unidad de tiempo (por ejemplo, min), por ejemplo mmol/g/min. La captación específica de H₂ por el cultivo excede la captación específica de CO por el cultivo. En la presente invención, la relación de captación específica de H₂:CO por el cultivo es de al menos 1,4:1, al menos 1,6:1, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 5:1, o al menos 10:1.

La captación de H₂ y/o CO₂ puede verse afectada cuando la concentración de etanol y/o acetato en el caldo de fermentación es alta, o al menos por encima de un cierto umbral. Por ejemplo, la captación de H₂ puede verse afectada cuando la concentración de acetato excede aproximadamente 10 g/l o aproximadamente 20 g/l. Para reducir el grado de deterioro de la captación de H₂, los productos producidos por el cultivo bacteriano pueden eliminarse continuamente del reactor o caldo de fermentación. Puede requerirse una densidad celular suficientemente alta para lograr un consumo eficiente de H₂ por el cultivo. La captación del CO₂ puede iniciarse por biomasa insalubre, exceso de suministro de gas, alta concentración de etanol y/o presencia de contaminantes.

El cultivo bacteriano puede crecer en cualquier medio nutriente líquido que proporcione recursos suficientes para el cultivo. El medio nutriente líquido puede contener, por ejemplo, vitaminas, minerales y agua. Se conocen en la técnica ejemplos de medios nutritivos líquidos adecuados, incluyendo medios anaerobios adecuados para la fermentación de etanol u otros productos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.173.429, la Patente de EE.UU. 5.593.886 y el documento WO 2002/08438).

El cultivo bacteriano puede estar contenido en un reactor (biorreactor). El reactor puede ser cualquier dispositivo de fermentación que tenga uno o más recipientes y/o torres o disposiciones de tuberías para el crecimiento de un cultivo bacteriano. El reactor puede ser, por ejemplo, un reactor celular inmovilizado, un reactor de inyección de gas, un

reactor de columna de burbujas (BCR), un reactor de circuito circulado, un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueca (HFM BR), un reactor de tanque agitado de flujo continuo (CSTR), o un reactor de lecho de goteo (TBR). El reactor está típicamente adaptado para recibir un sustrato gaseoso que comprende H₂, CO₂ y CO. El reactor puede comprender múltiples reactores (etapas), ya sea en paralelo o en serie. Por ejemplo, el reactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que se cultivan las bacterias y un segundo reactor de fermentación, al que se puede alimentar el caldo de fermentación del reactor de crecimiento y en el que se puede producir la mayoría de los productos de fermentación.

Las realizaciones de la invención se describen a modo de ejemplo.

En la presente invención, el sustrato es gaseoso. Las etapas particulares se pueden acoplar mediante medios de conducto adecuados o se pueden configurar para recibir o dejar pasar corrientes a través de un sistema. Puede proporcionarse una bomba o compresor para facilitar el suministro de las corrientes a etapas particulares. Adicionalmente, se puede usar un compresor para aumentar la presión del gas suministrado a una o más etapas.

Además, los sistemas o procesos pueden incluir opcionalmente medios para regular y/o controlar otros parámetros para mejorar la eficiencia general del proceso. Se pueden incorporar uno o más procesadores en el sistema para regular y/o controlar parámetros particulares del proceso. Por ejemplo, el sistema puede comprender un medio de determinación para controlar la composición del sustrato y/o las corrientes de escape. Además, los ejemplos particulares pueden incluir un medio para controlar el suministro de corrientes de sustrato a etapas o elementos particulares dentro de un sistema particular si los medios de determinación determinan que la corriente tiene una composición adecuada para una etapa particular. Por ejemplo, en los casos donde una corriente de sustrato gaseoso contiene niveles bajos de CO₂ o H₂ o niveles altos de O₂ que pueden ser perjudiciales para una reacción de fermentación, la corriente de sustrato puede desviarse del biorreactor. El sistema también puede incluir medios para supervisar y controlar el destino de una corriente de sustrato y/o el caudal, de tal manera que puede suministrarse una corriente con una composición deseada o adecuada a una etapa particular.

Adicionalmente, puede ser necesario calentar o enfriar determinados componentes del sistema o corrientes de sustrato antes o durante una o más etapas del proceso. En dichos casos, se puede usar cualquier medio de calentamiento o enfriamiento conocido. Por ejemplo, se pueden emplear intercambiadores de calor para calentar o enfriar las corrientes de sustrato.

Las condiciones de reacción se pueden supervisar y ajustar para optimizar la tasa de crecimiento bacteriano y/o la producción de producto en el reactor. La fermentación debe llevarse a cabo de manera deseable en condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación deseada (por ejemplo, CO₂ a alcohol). Tales condiciones de reacción incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial redox de los medios, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones de sustrato (para asegurar que el H₂, el CO₂ y/o el CO en la fase líquida no se vuelven limitantes) y las concentraciones del producto (para evitar la inhibición del producto).

Se conocen bien en la técnica los métodos generales para cultivar bacterias anaerobias. Se proporcionan técnicas ejemplares en: (i) Klasson, Resour Conserv Recycl, 5: 145-165, 1991; (ii) Klasson, Fuel, 70: 605-614, 1991; (iii) Klasson, Enzyme Microbial Technol, 14: 602-608, 1992; (iv) Vega, Biotech Bioeng, 34: 785-793, 1989; (v) Vega, Biotech Bioeng, 34: 774-784, 1989; (vi) Vega, Resour Conserv Recycl, 3: 149-160, 1990. Adicionalmente, los procesos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos se conocen bien en la técnica. Los procesos ejemplares incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en los documentos WO 2007/117157, WO 2008/115080, Patente de EE.UU. 6.340.581, Patente de EE.UU. 6.136.577, Patente de EE.UU. 5.593.886, Patente de EE.UU. 5.807.722 y Patente de EE.UU. 5.821.111.

El pH de los contenidos del reactor se puede ajustar según sea necesario. El pH apropiado dependerá de las condiciones requeridas para una reacción de fermentación particular, teniendo en cuenta el medio nutritivo líquido y las bacterias utilizadas. En un ejemplo que implica la fermentación de un sustrato gaseoso que contiene H₂, CO₂ y CO por *Clostridium autoethanogenum*, el pH se puede ajustar a aproximadamente 4,5 a 6,5, típicamente a aproximadamente 5 a 5,5. Otros ejemplos incluyen un pH de 5,5 a 6,5 usando *Moorella thermoacetica* para la producción de ácido acético, un pH de 4,5 a 6,5 usando *Clostridium acetobutylicum* para la producción de butanol y un pH de 7 usando *Carboxydotherrnus hygrogenafomans* para la producción de hidrógeno. Los medios para ajustar y mantener el pH de un reactor se conocen bien en la técnica. Tales medios pueden incluir el uso de bases acuosas, tales como NaOH o NH₄OH, y ácidos acuosos, tal como H₂SO₄.

Típicamente, el reactor está configurado para proporcionar suficiente transferencia de masa para permitir que las bacterias accedan al sustrato gaseoso, particularmente el H₂ en el sustrato gaseoso. Los largos tiempos de residencia del gas generan una alta captación de gas por parte de las bacterias. Por ejemplo, el reactor es un reactor de bucle circulado que comprende un segmento ascendente y un segmento descendente a través del cual se hace circular el sustrato gaseoso y los medios nutrientes líquidos. El reactor puede incluir adicionalmente una amplia gama de módulos de contacto gas/líquido adecuados que pueden proporcionar una transferencia de masa efectiva. Un módulo de contacto puede proporcionar un entorno geométrico único que permite que el gas y el líquido se mezclen

completamente a lo largo de una trayectoria de flujo establecida, haciendo que el gas arrastrado se disuelva en el líquido de manera más uniforme. A modo de ejemplo, este módulo de contacto puede incluir, aunque sin limitación, una matriz de embalaje de metal corrugado estructurado, embalaje aleatorio, placas de tamiz, y/o mezcladores estáticos.

5 La velocidad de transferencia de masa del sustrato gaseoso al cultivo bacteriano puede controlarse, de modo que el cultivo bacteriano se suministre con sustrato gaseoso en o cerca de una tasa de suministro óptima. La velocidad de transferencia de masa puede controlarse controlando la presión parcial del sustrato gaseoso y/o controlando el caudal del líquido o la retención de gas. La velocidad de introducción del sustrato gaseoso puede supervisarse para asegurar que la concentración de H₂, CO₂ y/o CO en la fase líquida no se vuelven limitantes. Por ejemplo, La transferencia de masa se controla controlando la presión parcial del sustrato gaseoso que entra en el reactor.

15 Puede ser preferible realizar la fermentación a presión elevada, es decir, a una presión superior a la presión ambiente. Operar a presiones incrementadas permite un aumento significativo en la tasa de H₂, CO₂ y/o CO que se transfieren de la fase gaseosa a la fase líquida, donde las bacterias pueden captarlo como fuente de carbono para la producción de productos, tales como etanol. El tiempo de retención (el volumen de líquido en el biorreactor dividido por el caudal de gas de entrada) puede reducirse cuando el reactor se mantiene a una presión elevada en lugar de a la presión atmosférica. Asimismo, debido a que una tasa de conversión de CO/CO₂/H₂ a etanol dada es en parte una función del tiempo de retención del sustrato, y lograr un tiempo de retención deseado a su vez determina el volumen requerido de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir considerablemente el volumen del biorreactor requerido y, en consecuencia, el coste de capital del equipo de fermentación. De acuerdo con los ejemplos dados en la Patente de EE.UU. 5.593.886, el volumen del reactor se puede reducir en proporción lineal a los aumentos en la presión de operación del reactor. Por ejemplo, los reactores operados a 10 atmósferas de presión solo necesitan una décima parte del volumen de los operados a 1 atmósfera de presión. Los beneficios de realizar una fermentación de gas a etanol a presiones elevadas también se han descrito en otros lugares. Por ejemplo, el documento WO 2002/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones de 206,8 kPa (30 psig) y 517,1 kPa (75 psig), dando productividades de etanol de 150 g/l/día y 369 g/l/día, respectivamente. Sin embargo, las fermentaciones de ejemplo realizadas usando medios similares y composiciones de gas de entrada a presión atmosférica produjeron entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

30 El cultivo bacteriano puede producir uno o más productos. Al menos una parte del CO₂ en el material de alimentación gaseoso se convierte en productos, de modo que al menos una parte del carbono en los productos se deriva del carbono en el CO₂ en el sustrato gaseoso. Por ejemplo, al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, o al menos un 90 % del carbono en los productos se pueden derivar del carbono en el CO₂ en el sustrato gaseoso. La cantidad de CO₂ en el gas que sale del reactor es inferior a la cantidad de CO₂ en el gas que entra en el reactor (es decir, inferior a la cantidad de CO₂ en el sustrato gaseoso). En una realización, la cantidad de CO₂ en el gas que sale del reactor es al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, o al menos un 90 % inferior a la cantidad de CO₂ en el gas que entra en el reactor.

45 Los productos pueden incluir alcoholes, ácidos, u otros productos químicos. Tales productos también pueden incluir gases producidos por el proceso de fermentación. En particular, el cultivo puede producir uno o más de etanol, ácido acético (o acetato), 2,3-butanodiol, butanol, isopropanol, lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), propanodiol, 2-propanol, acetoína, isobutanol, citramalato, butadieno, ácido poliláctico, isobutileno, 3-hidroxipropionato (3HP), acetona y ácidos grasos. Los inventores son los primeros en demostrar una alta producción de etanol a través del consumo de CO₂ en la fermentación de gas. Por ejemplo, el cultivo produce uno o más de etanol, acetato y 2,3-butanodiol.

50 El cultivo puede producir etanol y acetato en cantidades variables. Por ejemplo, el cultivo puede producir etanol y acetato en una relación de aproximadamente 1:1. Por ejemplo, el cultivo produce etanol y acetato en una relación de al menos 1,5:1, al menos 2:1, al menos 3:1, o al menos 5:1. El cultivo puede producir etanol a una concentración de al menos 10 g/l o al menos 15 g/l. El cultivo puede producir acetato o ácido acético en una concentración de 20 g/l o menos o 10 g/l o menos.

55 El proceso o método puede comprender recuperar uno o más productos usando cualquier medio conocido en la técnica. Los métodos ejemplares se describen en los documentos WO 2007/117157, WO 2008/115080, Patente de EE.UU. 6.340.581, Patente de EE.UU. 6.136.577, Patente de EE.UU. 5.821.111, Patente de EE.UU. 5.807.722 y Patente de EE.UU. 5.593.886.

60 El etanol se puede recuperar del caldo de fermentación, por ejemplo, por métodos tales como destilación fraccionada o evaporación o fermentación extractiva. La destilación de etanol de un caldo de fermentación produce una mezcla azeotrópica de etanol y agua (por ejemplo, 95 % de etanol y 5 % de agua). El etanol anhidro se puede obtener posteriormente mediante el uso de tecnología de deshidratación con etanol de tamiz molecular, que es bien conocido en la técnica. La fermentación extractiva implica el uso de un disolvente miscible con agua que presenta un bajo riesgo de toxicidad para el microorganismo de fermentación para recuperar el etanol del caldo de fermentación diluido. Por

ejemplo, se puede usar alcohol olefílico como disolvente en la fermentación extractiva. Cuando el alcohol olefílico se introduce continuamente en un fermentador, este se eleva para formar una capa en la parte superior del caldo de fermentación. Esta capa puede extraerse después y alimentarse a través de una centrífuga. El agua y las células se separan fácilmente del alcohol olefílico y se devuelven al fermentador, mientras que el disolvente cargado de etanol se alimenta a una unidad de vaporización instantánea. La mayor parte del etanol se vaporiza y se condensa, mientras que el alcohol olefílico no volátil se recupera para su reutilización en la fermentación.

El acetato también se puede recuperar del caldo de fermentación usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un sistema de adsorción que implique un filtro de carbón activado. En este caso, las células microbianas generalmente se eliminan primero del caldo de fermentación utilizando un método de separación adecuado. En la técnica se conocen numerosos métodos basados en filtración para generar un caldo de fermentación sin células para la recuperación del producto. El permeado sin células, que contiene etanol y acetato, se hace pasar después a través de una columna que contiene carbón activado para adsorber el acetato. el acetato en forma ácida (ácido acético) en lugar de la forma de sal (acetato) es más fácilmente adsorbido por el carbón activado. Por lo tanto, se prefiere que el pH del caldo de fermentación se reduzca a menos de aproximadamente 3 antes de pasar a través de la columna de carbón activado para convertir la mayoría del acetato a la forma de ácido acético.

Los productos de la reacción de fermentación se pueden recuperar del caldo de fermentación retirando continuamente una parte del caldo del biorreactor de fermentación, separando las células microbianas del caldo y recuperando uno o más productos del caldo de forma simultánea o secuencial. Las células microbianas separadas pueden devolverse al reactor de fermentación. El permeado libre de células que queda después de haber eliminado el etanol y el acetato también puede devolverse al reactor de fermentación. Se pueden añadir nutrientes adicionales, tales como vitaminas B, para reponer el permeado libre de células antes de devolverlo al reactor. Si el pH del caldo se ajustó para mejorar la adsorción de ácido acético al carbón activado, el pH del permeado libre de células también puede necesitar reajustarse.

El reactor puede integrarse con un sistema de reciclaje de células que proporciona un medio para separar las bacterias del permeado de modo que las bacterias puedan devolverse al reactor para una mayor fermentación. Un módulo de reciclaje de células puede extraer continuamente el permeado del caldo, mientras retiene las células. El sistema de reciclaje de celdas puede incluir, aunque sin limitación, membranas de reciclaje celular y separadores centrífugos de disco.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la preparación, inoculación y fermentación de cuatro biorreactores (reactores 1-4).

A un biorreactor de 2 l, se añadieron los siguientes componentes para obtener un volumen de trabajo de 1,5 l; 1450 ml H₂O, 37,5 ml de KCl 1 M, 3 ml de NaCl 1 M, 3 ml de MgCl₂ 1 M, 3 ml de CaCl₂ 1 M, 0,6 ml de H₃PO₄ al 85 %, 1,5 ml de resazurina (2 g/l), 7,5 ml de solución de metales traza y 30 ml de solución madre de vitamina B.

Medios	Concentración (mM/l)
MgCl ₂ 6 H ₂ O	2
NaCl	2
CaCl ₂ 6 H ₂ O	2
KCl	25
H ₃ PO ₄ 85 %	0,375 ml
Solución de metal traza	5 ml (1x)
Solución de vitamina B	20 ml (2x)

Solución de metal traza	Concentración final en el medio (µmol/l) 1x	Concentración (mM/l) en 200 x solución madre
FeCl ₂ 4 H ₂ O	100	20
CoCl ₂ 6 H ₂ O	5	1
ZnCl ₂	5	1
H ₃ BO ₃	2	0,4
MnCl ₂ 4 H ₂ O	2	0,4
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	2	0,4

(continuación)

Solución de metal traza	Concentración final en el medio ($\mu\text{mol/l}$) 1x	Concentración (mM/l) en 200 x solución madre
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2	0,4
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2	0,4
Na_2SeO_3	2	0,4

Solución madre de vitamina B	Concentración final en el medio (mg/l) 2x	Concentración (mg/l) en 100 x solución madre
Hidrocloruro de tiamina (B1)	1	50
Riboflavina (B2)	1	50
Ácido nicotínico (B3)	1	50
Ácido pantoténico (B5)	1	50
Clorhidrato de piridoxina (B6)	0,2	10
Biotina (B7)	0,4	20
Ácido fólico (b9)	0,2	10
Ácido 4-aminobenzoico (PABA o B10)	1	50
Cianocobalamina (B12)	1	50
Ácido lipoico (ácido tiótico)	1	50

5 La agitación se conectó a 300 rpm y el reactor se calentó a 37 °C. El N_2 se pulverizó a 200 ml/min durante al menos 1 hora. El gas de entrada se cambió entonces a 50 ml/min de RMG a 300 rpm. El goteo de Na_2S comenzó a 0,3 ml/hora. Se ajustó el ORP para que estuviera dentro de -150 mV a -250 mV. Se utilizó Cr(II) para ajustar el ORP según sea necesario para mantener el valor dentro del intervalo identificado. Se usó NH_4OH (5 M) como compensación de base.

10 Después se inoculó el reactor con 200 ml de un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* en crecimiento activo. El cultivo comprendía la cepa DSMZ23693 de *Clostridium autoethanogenum*.

0069 Después se fermentaron los reactores 1-4, como se describe a continuación. Los valores listados son aproximados, permitiendo una desviación de $\sim \pm 0,5\%$ entre las mediciones de GC.

15

Reactor 1

Día	Notas	Gas
0	Composición del gas de alimentación de inicio	56,5 % H_2 , 4,7 % N_2 , 7,63 % CO , y 30,92 % CO_2
2,0	El hidrógeno en la alimentación de gas se cambió por nitrógeno	1,1 % H_2 , 72,6 % N_2 , 18,1 % CO , y 6,0 % CO_2
7,01	El nitrógeno en la alimentación de gas se cambió de nuevo a hidrógeno	68,4 % H_2 , 11,5 % N_2 , 21,1 % CO , y 6,9 % CO_2
15	La velocidad de bombeo de los medios se incrementó a 2,4 RPM; la alimentación de gas se ajustó para reemplazar el gas de la fábrica	59,8 % H_2 , 12,1 % N_2 , 18,2 % CO , y 13,7 % CO_2
21	CO reducido a la diana de 10 % CO	59,6 % H_2 , 20,6 % N_2 , 10,7 % CO , y 14,1 % CO_2
27	CO reducido a la diana 7 % CO	48,1 % H_2 , 23,8 % N_2 , 7,6 % CO , y 16,8 % CO_2

La Fig. 1 muestra la cantidad de CO , CO_2 y H_2 consumidos por el cultivo en el reactor 1.

Reactor 2

Día	Notas	Gas
0	Composición del gas de alimentación de inicio: RMG	3,3 % H_2 , 27,2 % N_2 , 48,8 % CO , y 15,1 % CO_2
5,2	Combinación de alto contenido de hidrógeno	69,8 % H_2 , 9,9 % N_2 , 18,6 % CO , y 6,0 % CO_2

(continuación)

Día	Notas	Gas
8,3		71,3 % H ₂ , 3,4 % N ₂ , 6,1 % CO, y 20,7 % CO ₂
12,3		44,4 % H ₂ , 33,3 % N ₂ , 4,75 % CO, y 16,5 % CO ₂
19,2	La alimentación de gas se cambió a gas de fábrica, la bomba de medios se incrementó a 30 % y la tasa de sangrado de permeado se redujo a 0,7 ml/min; La tasa de gas se duplicó de 100 a 200 ml/min	3,2 % H ₂ , 26,5 % N ₂ , 50,6 % CO, y 15,3 % CO ₂
22,4	La tasa de gas se redujo y la composición del gas se cambió para que comprendiera una relación de H ₂ :CO 4:1	52,2 % H ₂ , 7,3 % N ₂ , 14,4 % CO, 23,6 % CO ₂
27,2	El hidrógeno en la alimentación de gas se intercambió por nitrógeno	0,9 % H ₂ , 56,8 % N ₂ , 13,9 % CO, y 22,2 % CO ₂
29,04	La alimentación de gas se cambió de nuevo a mezcla de gas de fábrica	52,0 % H ₂ , 3,2 % N ₂ , 18,6 % CO, y 25,7 % CO ₂
29,9	la relación H ₂ :CO de entrada se ajustó ligeramente	54,6 % H ₂ , 2,8 % N ₂ , 16,1 % CO, y 25,9 % CO ₂
33,0	El hidrógeno se cambió por nitrógeno	0,36 % H ₂ , 52,95 % N ₂ , 16,1 % CO, y 23,8 % CO ₂

La Fig. 2 muestra la cantidad de CO, CO₂ y H₂ consumidos por el cultivo en el reactor 2.

Reactor 3

Día	Notas	Gas
0	Composición del gas de alimentación de inicio: RMG	3,12 % H ₂ , 26,6 % N ₂ , 50,5 % CO, y 15,13 % CO ₂
0,18		56,6 % H ₂ , 2,54 % N ₂ , 19,5 % CO, 22,3 % CO ₂
6,0	El hidrógeno se cambió por nitrógeno	0,28 % H ₂ , 55,5 % N ₂ , 18,6 % CO, y 20,3 % CO ₂
10,9	El nitrógeno se cambió de nuevo a H ₂	57,3 % H ₂ , 2,96 % N ₂ , 19,5 % CO, y 22,2 % CO ₂
17,2		68,1 % H ₂ , 2,82 % N ₂ , 19,1 % CO, y 14,4 % CO ₂
19,1	El gas de fábrica en la alimentación de gas se intercambió por una mezcla de gas completamente sintética	59,9 % H ₂ , 10,3 % N ₂ , 18,9 % CO, y 12,3 % CO ₂
25	Se cambió el gas de alimentación a la diana CO 10 %	50,7 % H ₂ , 20,6 % N ₂ , 9,9 % CO, y 15,8 % CO ₂
31,2	Se cambió el gas de alimentación a la diana CO 7 %	49,8 % H ₂ , 23,4 % N ₂ , 7,1 % CO, y 15,6 % CO ₂
40,1		56,7 % H ₂ , 4,8 % N ₂ , 19,3 % CO, y 14,9 % CO ₂

5 La Fig. 3 muestra la cantidad de CO, CO₂ y H₂ consumidos por el cultivo en el reactor 3.

Reactor 4

Día	Notas	Gas
0	Composición del gas de alimentación de inicio	55,9 % H ₂ , 6,6 % N ₂ , 23,2 % CO, y 8,9 % CO ₂
1,1	El cultivo continuo comenzó con una tasa de dilución de 1,18 volúmenes de reactor por día	
5,2	Combinación de gases ajustada	59,5 % H ₂ , 7,2 % N ₂ , 17,5 % CO, y 10,2 % CO ₂
7,1	Tasa de dilución reducida a 0,6 volúmenes de reactor por día	
7,94	Alimentación de medios alterada para tener 1/10 ^o de la cantidad convencional de molibdeno	

(continuación)

Día	Notas	Gas
13,2	El molibdeno volvió a la concentración normal	
15,5	Combinación de gases ajustada	51,7 % H ₂ , 3,1 % N ₂ , 20,2 % CO, y 21,6 % CO ₂
19	Comenzó el reciclaje de células, con un D _{residuo} de 0,06 volúmenes de reactor por día	
20	Reciclaje celular relajado a D _{residuo} de 0,15 volúmenes de reactor por día	

La Fig. 4 muestra la cantidad de CO, CO₂ y H₂ consumidos por el cultivo en el reactor 4.

5 En los cuatro reactores, el consumo de CO₂ se demostró cuando la composición de alimentación de gas se alteró para que comprendiera un exceso de hidrógeno. En el reactor 3, la cantidad de CO₂ consumida fue mayor que la cantidad de CO consumida después de la reducción del volumen de CO en el gas de alimentación. Esto indica que se utilizó CO₂ como fuente de carbono principal cuando hay un exceso de H₂ disponible en el sustrato.

10 **Ejemplo 2** (ejemplo de referencia)

Este ejemplo demuestra que H₂ reacciona con CO₂ en un amplio intervalo.

15 H₂, El consumo de CO y CO₂ por los cultivos de *Clostridium autoethanogenum* se midió utilizando métodos convencionales. En particular, los caudales de los gases de entrada y salida del reactor se midieron utilizando un controlador de flujo másico y las composiciones de los gases de entrada y salida del reactor se midieron utilizando cromatografía de gases (GC). Las tasas de consumo de H₂, CO y CO₂, expresadas en unidades de mmol/l de caldo/día, se calcularon a partir del flujo de gas de salida. El N₂ no fue consumido por el cultivo, de modo que el N₂ en el gas de entrada era equivalente al N₂ en el gas de salida. El cultivo puede consumir el CO₂ disponible en el gas de entrada (alimentación) y/o el CO₂ producido por el cultivo.

20 La Fig. 5 muestra que el CO₂ se hace reaccionar con H₂ a una relación dada, y que el cultivo consumía no solo el CO₂ producido mediante la reacción de CO, sino también el CO₂ proporcionado en el gas de alimentación, siempre y cuando haya H₂ disponible. La Fig. 5 demuestra que se logró el consumo neto de CO₂. El eje y de la Fig. 5 se calculó dividiendo el consumo neto (un número negativo) o la producción (un número positivo) de CO₂ por el consumo de CO (un número negativo), y convirtiendo la fracción en un valor porcentual. El eje x de la Fig. 5 se calculó como la relación fraccional de la tasa de H₂ consumido por la tasa de CO consumido. **Ejemplo 3** (ejemplo de referencia)

Este ejemplo demuestra que aumentar el porcentaje de H₂ en un sustrato gaseoso aumenta la relación de etanol:2,3-butanodiol (BDO) producida por un cultivo de fermentación.

30 La Fig. 6 muestra los productos metabólicos de un cultivo de fermentación de *Clostridium autoethanogenum*. En el día 20, el H₂ en el gas de alimentación se aumentó de 5 % a 34 % y el CO en el gas de alimentación se redujo del 26 % al 20 %. La producción de BDO se redujo de 4,3 g/l a 0,9 g/l y aumentó la relación de etanol:BDO. La utilización de H₂ aumentó del 15 % al 58 %. La biomasa disminuyó a un D_{residuo} de 0,7.

35 El H₂ en el gas de alimentación puede ser consumido en gran parte (> 50 %) cuando la utilización de CO es alta, es decir, cuando el CO disuelto es bajo. Usando un balance de ATP, se predijo que la tasa de crecimiento celular sería más lenta cuando el H₂ fuera un co-sustrato junto con el CO. Se observó que la tasa de producción de BDO se redujo como resultado directo de la concentración del CO₂ disuelto en el caldo, y que el CO₂ disuelto en el caldo estaba relacionado linealmente con la presión parcial de CO₂ (o linealmente relacionado con la concentración de salida de CO₂ a una presión operativa atmosférica fija), de tal manera que la tasa de producción de BDO estaba inversamente relacionada con el consumo de CO₂. D_{residuo}, el tiempo de residencia de las bacterias en el reactor, se puede ajustar para mantener la concentración de bacterias en el reactor en un valor óptimo. A medida que se consume más H₂, D_{residuo} puede reducirse bombeando más caldo a través de la membrana celular.

45 **Ejemplo 4** (ejemplo de referencia)

Este ejemplo demuestra que la relación de H₂/CO reaccionado afecta a la producción del producto. En particular, este ejemplo demuestra que la biomasa y la BDO disminuyen a medida que la relación de H₂:CO aumenta en el gas de alimentación.

55 La Fig. 7 muestra puntos de datos para una serie de experimentos similares al experimento descrito en el Ejemplo 3. El eje y es la relación de la tasa de carbono convertido a biomasa y BDO a la tasa de consumo de H₂ y CO. Si la producción de producto no se vio afectada por la relación de consumo de H₂/CO, entonces la tendencia no disminuiría con un aumento en el H₂/CO reaccionado (es decir, se observaría una línea de tendencia horizontal).

- Se debe interpretar que los términos "un", "uno/una", "el/la" y términos similares usados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significa "que incluye, aunque no se limita a,") a menos que se indique de otro modo. La enumeración de intervalos de valores está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento.
- 5
- 10 Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento, pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no plantear una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión de la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.
- 15

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de esta invención. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia enunciada en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para mejorar la captura de carbono en la fermentación de gas, comprendiendo el proceso proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO, H₂ y CO₂ a un cultivo bacteriano en un medio nutriente líquido y fermentar el cultivo, en donde al menos una parte del CO₂ en el sustrato gaseoso se convierte en uno o más productos por el cultivo, estando el proceso **caracterizado por que**:
- 10 a. la relación de H₂:CO en el sustrato gaseoso es al menos 5:1;
 b. la relación de CO₂:CO en el sustrato gaseoso está entre 1:1 y 4:1;
 c. la cantidad de CO₂ consumido por el cultivo excede o es igual a la cantidad de CO₂ producido por el cultivo;
 d. la relación de captación específica de H₂:CO por el cultivo es al menos 1,4:1; y
 e. las bacterias son carboxidotróficas *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*.
- 15 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde los productos comprenden uno o más de un alcohol y un ácido.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde el proceso comprende además recuperar uno o más productos.
- 20 4. El proceso de la reivindicación 1, en donde la captación de CO₂ por el cultivo es de al menos 500 mmol/l/día de CO₂.
5. El proceso de la reivindicación 1, en donde la cantidad de CO₂ que sale del reactor es al menos un 5 % menor que una cantidad de CO₂ que entra en el reactor.
- 25 6. El proceso de la reivindicación 1, en donde el uno o más productos se seleccionan del grupo que consiste en etanol, ácido acético o acetato, 2,3-butanodiol, butanol, isopropanol, lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), propanodiol, 2-propanol, acetoína, isobutanol, citramalato, butadieno, ácido poliláctico, isobutileno, 3-hidroxipropionato (3HP), acetona y ácidos grasos.
7. El proceso de la reivindicación 1, en donde el sustrato gaseoso comprende 30-90 % H₂.

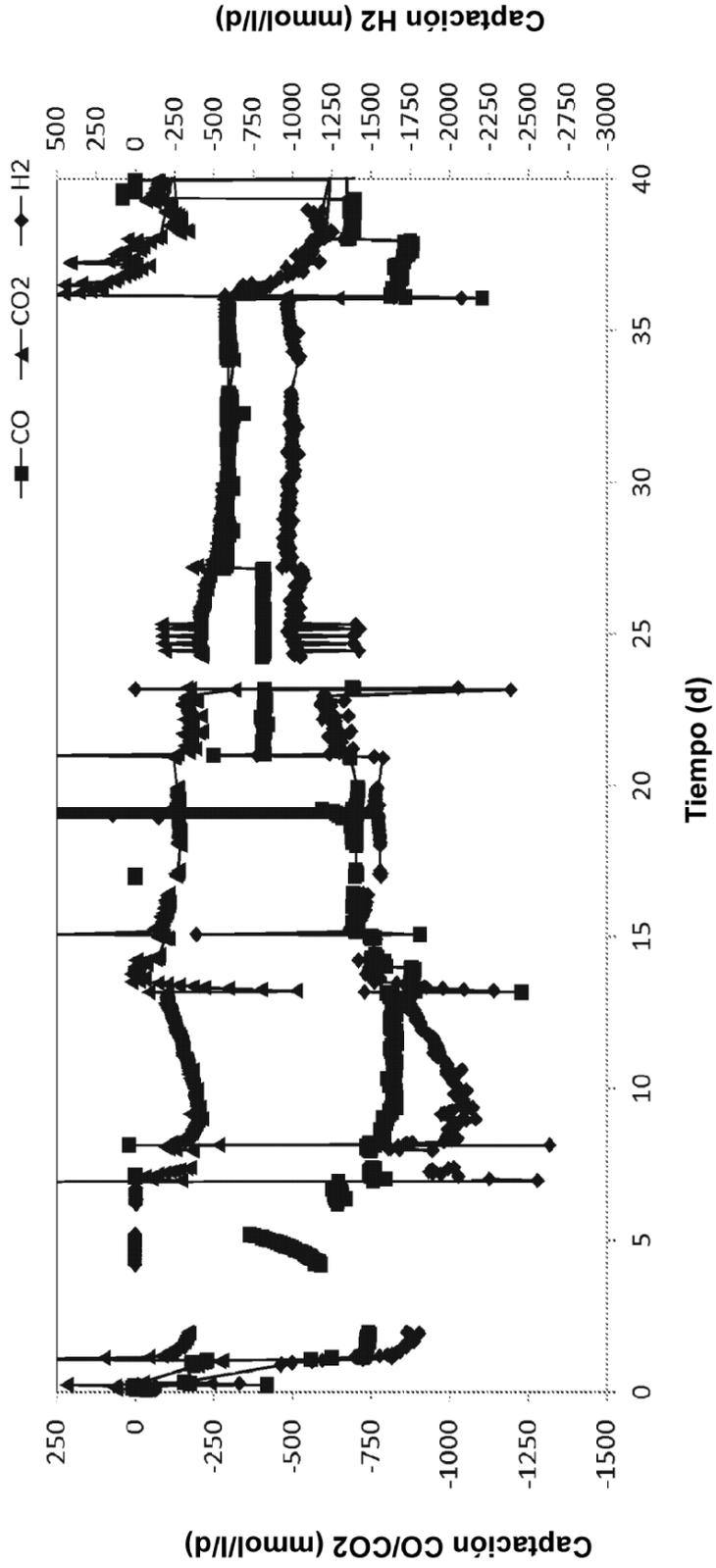


FIG. 1

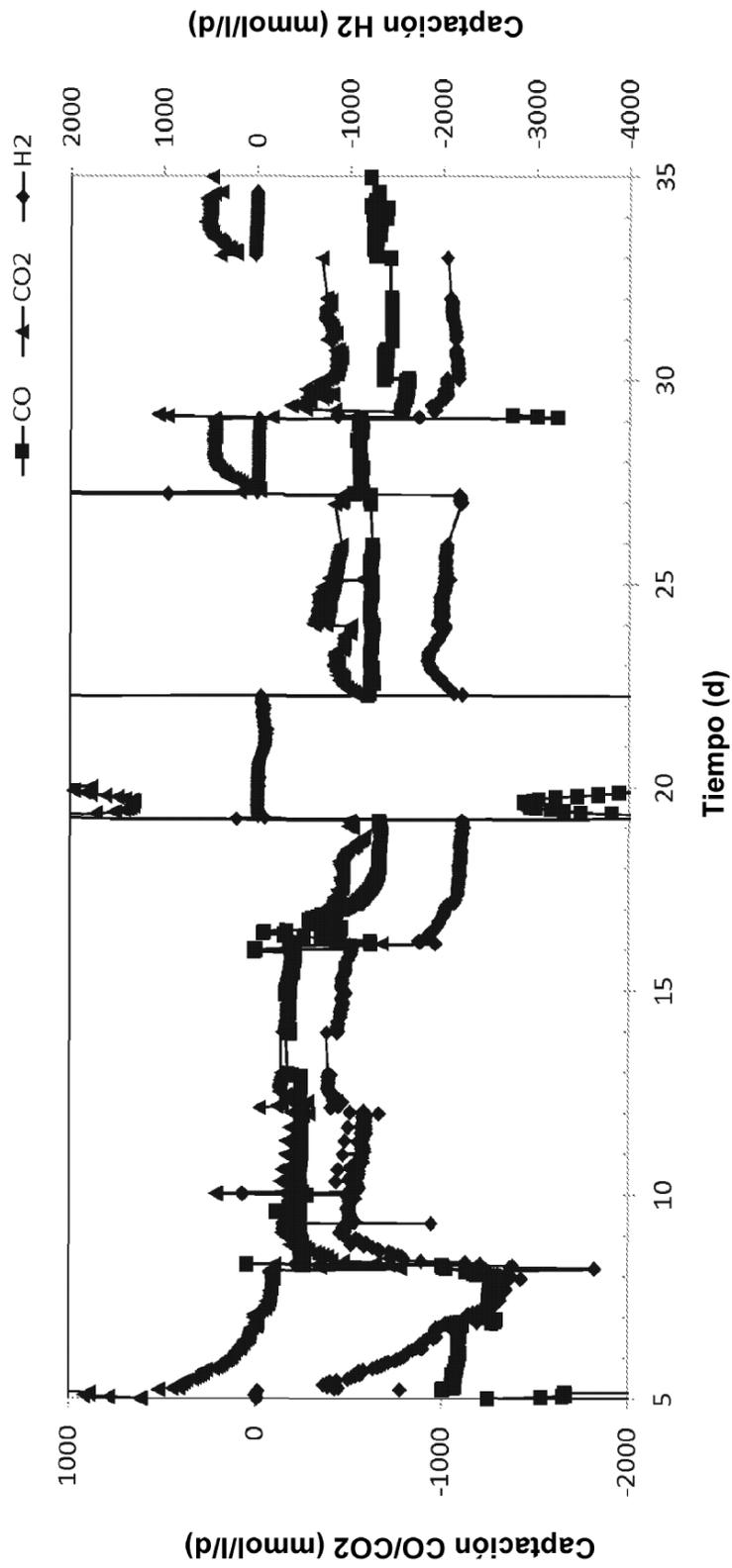


FIG. 2

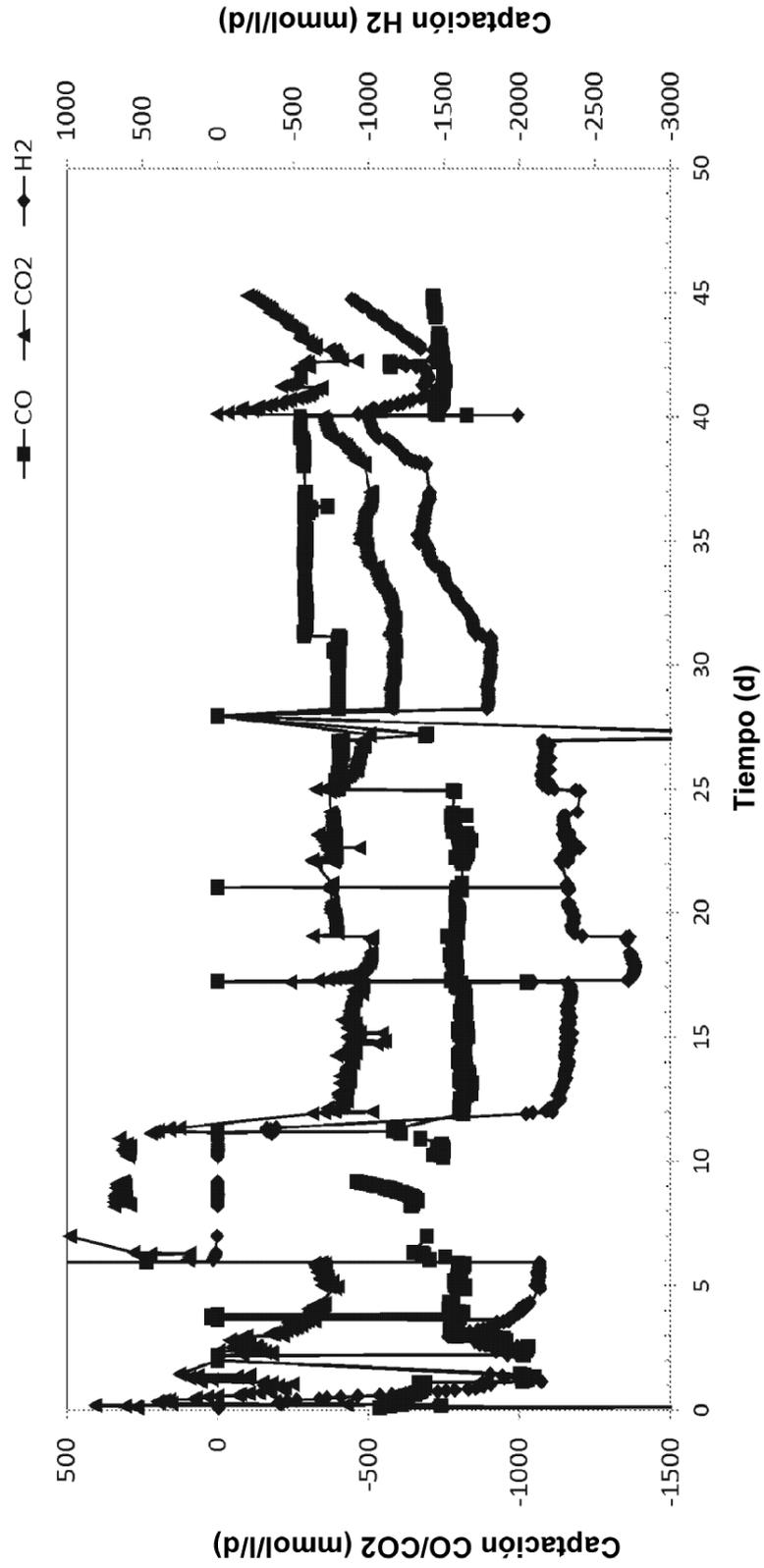


FIG. 3

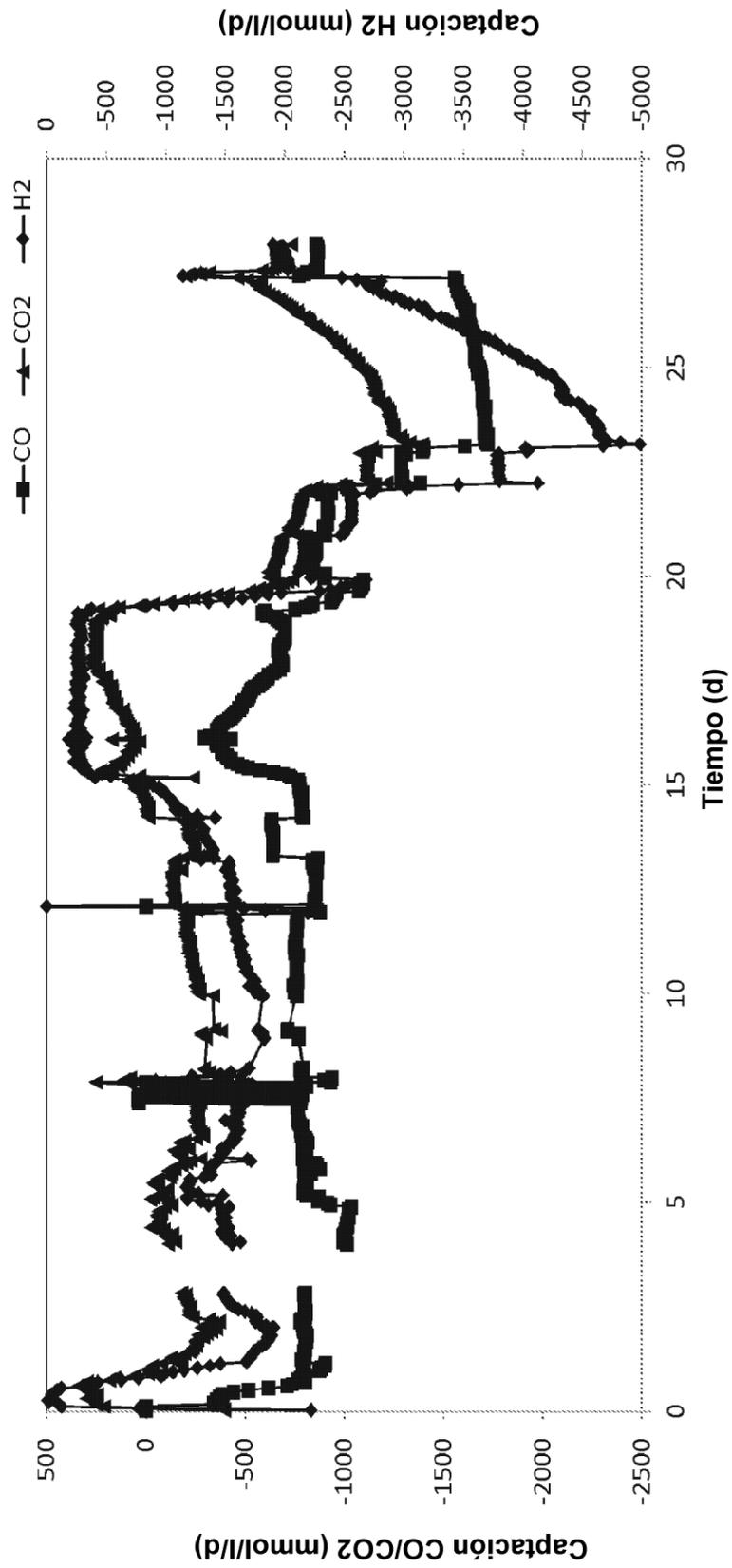


FIG. 4

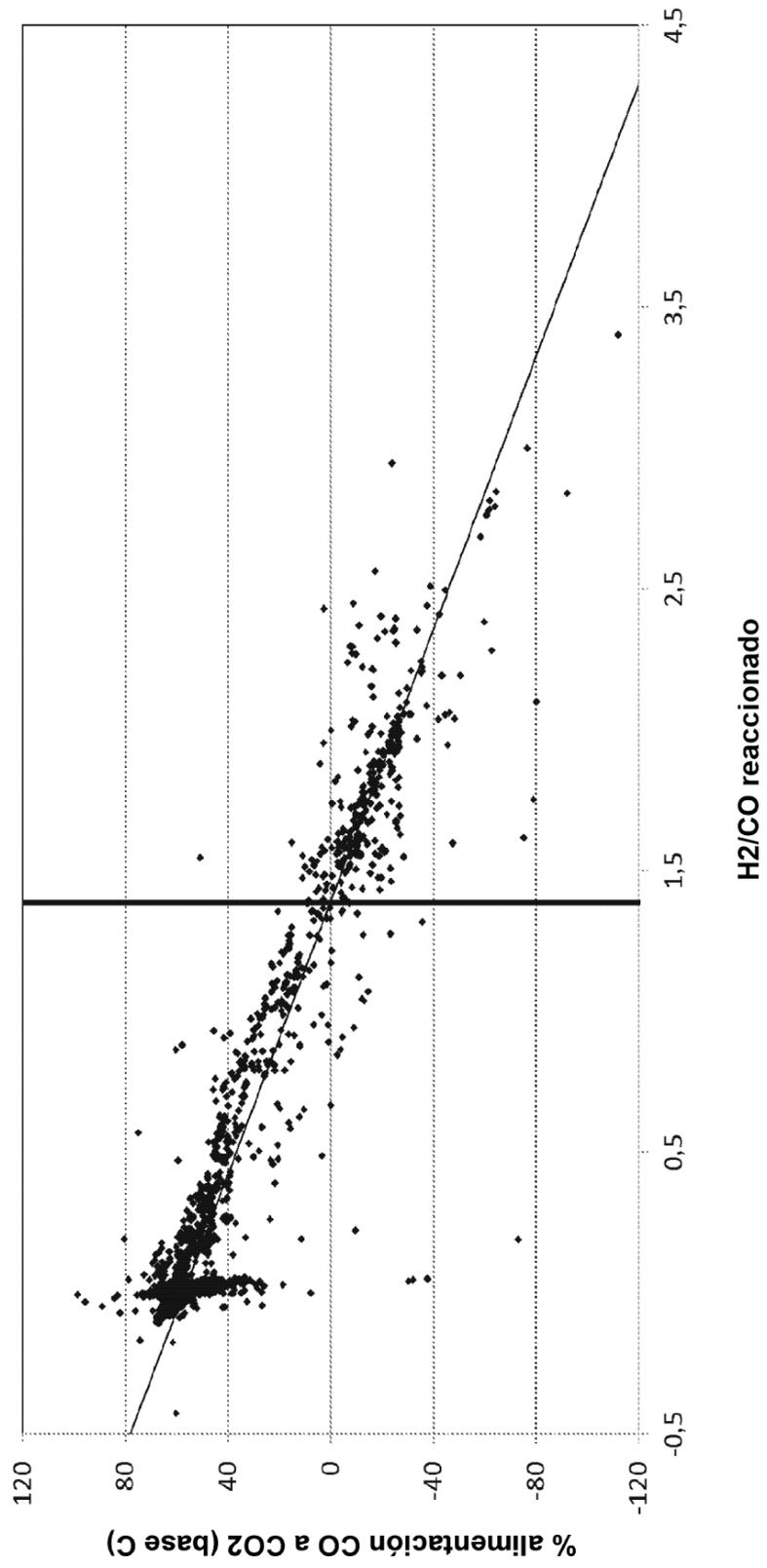


FIG. 5

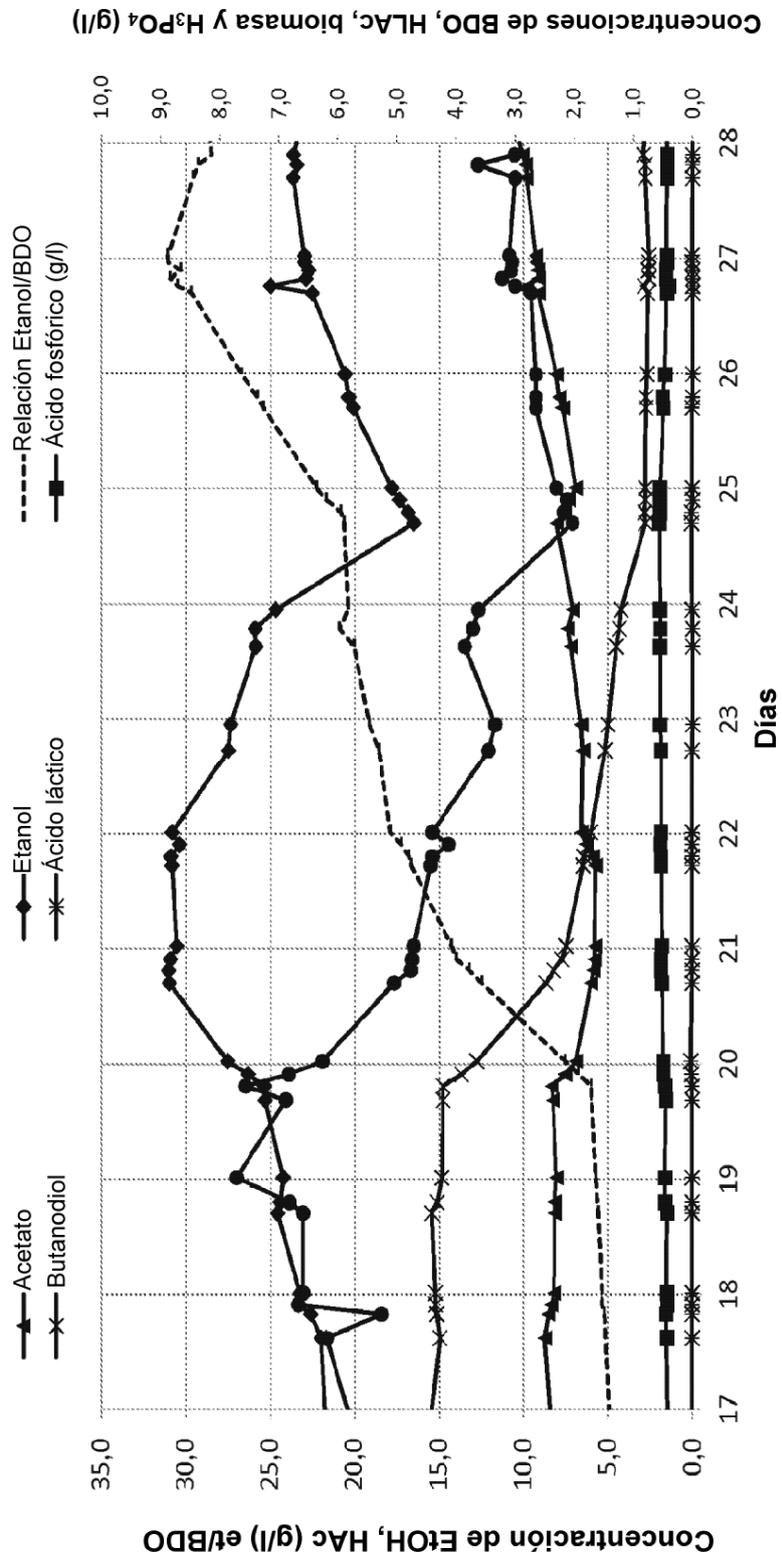


FIG. 6

