

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 976**

51 Int. Cl.:

C12P 7/04 (2006.01)

C12P 7/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2017 PCT/EP2017/062642**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2017 WO17202975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2017 E 17726611 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3464603**

54 Título: **Producción biotecnológica de propanol y/o ácido propiónico en presencia de acetato**

30 Prioridad:

27.05.2016 EP 16171624

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

14.10.2020

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Straße 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**HAAS, THOMAS;
BECK, SIMON y
HECKER, ANJA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 786 976 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

Producción biotecnológica de propanol y/o ácido propiónico en presencia de acetato

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento biotecnológico para producir propanol y/o ácido propiónico. En particular, se mantiene acetato a una concentración de al menos 1 g/l en medio acuoso durante el periodo de reacción.

10 Antecedentes de la invención

El propanol es un disolvente utilizado en la industria farmacéutica para resinas y ésteres de celulosa, entre otros compuestos. Este disolvente, mejor conocido como isopropanol o alcohol isopropílico, se utiliza ampliamente en tinta de impresión y en la industria de la impresión. El 1-propanol se produce en la naturaleza mediante la descomposición de materiales orgánicos por una diversidad de microorganismos y se puede encontrar en plantas y en aceite de fusel. El 1-propanol también se puede producir a partir de eteno derivado petroquímicamente mediante una reacción con monóxido de carbono e hidrógeno para dar propionaldehído, que después se hidrogena. También es un subproducto de la fabricación de metanol y puede producirse a partir de propano directamente o a partir de acroleína.

20 El propanol tiene otros usos potenciales. Uno de los usos importantes del propanol es que puede deshidratarse fácilmente para producir propileno, que es una de las materias primas químicas más importantes del mundo. Por ejemplo, el isopropanol (IPA) se produce actualmente utilizando propileno. En particular, mediante uno de dos procesos que utilizan precursores derivados petroquímicamente: (1) un proceso de dos etapas (indirecto) durante el cual el propileno se hidrogena y después se hidroliza utilizando ácido y agua o (2) un proceso de una etapa (directo) durante la cual se hidrogena propileno utilizando un catalizador ácido. El IPA es uno de los disolventes más importantes utilizados en la industria química. También es un importante intermedio químico. Es un componente de limpiadores, desinfectantes, aerosoles para habitaciones, lacas y diluyentes, adhesivos, productos farmacéuticos, cosméticos y artículos de tocador. También se utiliza como extractante y como agente deshidratante. El IPA también se utiliza como un aditivo de gasolina, para disolver agua y hielo en líneas y tanques de combustible, evitando así que el agua se acumule en las líneas de combustible y se congele a bajas temperaturas.

La demanda global de isopropanol y propileno continúa aumentando a una tasa de aproximadamente el 3% por año. Dado que en los procedimientos actuales de producción el isopropanol y el propileno se producen principalmente a partir del petróleo, los costes de estos compuestos se basarán en los costes del petróleo. Estos compuestos también se obtienen mediante el craqueo de gasolina o de petróleo, lo que es perjudicial para el medio ambiente. En consecuencia, existe la necesidad de una alternativa ecológica y biobasada para el proceso de producción basado en petróleo: la producción de IPA por fermentación a partir de biomasa renovable. Sin embargo, para ser viable y tener un rendimiento superior en el mercado petroquímico actual de IPA, un proceso fermentativo para la producción de IPA debe ser rentable.

40 El documento WO 2014/140336 divulga un procedimiento para producir propanol que comprende:

a) exponer sustratos gaseosos, por ejemplo CO₂, a un microorganismo fijador de C1 en una primera zona de fermentación; y,

b) hacer pasar el etanol y/o el acetato de la etapa a) a un microorganismo productor de C3, en una segunda zona de fermentación, para convertir el etanol y/o el acetato en propionato y/o propanol.

50 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento biotecnológico para producir propanol y/o ácido propiónico a partir de etanol en presencia de acetato y dióxido de carbono. En particular, el acetato está presente a una concentración de al menos 1 g/l en un medio que comprende un propionógeno y etanol. Más en particular, la reacción también puede comprender la adición de dióxido de carbono.

55 El procedimiento de la invención comprende así una etapa de (b) poner en contacto al menos un propionógeno con dióxido de carbono y con un medio acuoso que comprende etanol y acetato;

60 en el que el acetato se mantiene a una concentración de al menos aproximadamente 1 g/l en el medio acuoso durante el periodo de reacción.

En algunas formas de realización, el presente procedimiento también incluye una etapa adicional de preparación del acetato y etanol que se utiliza en la reacción principal tal como se define en la reivindicación 1.

65 La presencia de acetato en el medio acuoso que comprende el propionógeno aumenta la selectividad para la formación de propanol y/o ácido propiónico a partir de etanol. Por lo tanto, se forman menos subproductos tales como lactato y/o

butirato. Por lo tanto, se producirán menos desechos a partir de los materiales de partida, haciendo que la producción de propanol y/o ácido propiónico sea un proceso más rentable. En consecuencia, el rendimiento puede ser mayor y/o se puede obtener un rendimiento superior en un periodo de tiempo más corto. Además, el producto deseado, propanol y/o ácido propiónico, se puede extraer fácilmente sin etapas de purificación complicadas. Esto da como resultado un ahorro de costes y tiempo.

Un microorganismo capaz de convertir etanol en propanol y/o ácido propiónico se refiere a cualquier microorganismo que sea capaz de llevar a cabo la producción fermentativa de propanol y/o ácido propiónico. Este microorganismo es un propionógeno. Los propionógenos son microorganismos productores de C3. En particular, los propionógenos se refieren a cualquier microorganismo que sea capaz de convertir etanol y CO₂ de gas de síntesis a ácido propiónico y propanol. Los términos "propionógeno" o "microorganismo productor de C3" se refieren a microorganismos que, cuando se ponen en contacto con un sustrato, convierten el sustrato en propanol y/o ácido propiónico. Estos microorganismos pueden producir las enzimas apropiadas intracelularmente y/o extracelularmente. Estos microorganismos productores de propanol y/o ácido propiónico pueden ser capaces de utilizar materiales de partida para la fermentación de propanol y/o ácido propiónico que pueden ser materiales de desecho. Por ejemplo, pueden utilizarse CO₂, etanol y acetato derivados de gas de síntesis para la producción de propanol y/o ácido propiónico. Esto es particularmente ventajoso ya que se pueden utilizar materiales de partida económicos que originariamente se habrían considerado desechos. Esto también permite la eliminación de desechos, lo que en consecuencia reduce la contaminación ambiental. En un ejemplo, el propionógeno según la presente invención puede utilizar al menos la ruta de metilmalonilo-succinato o la ruta de lactato-acrilato para producir propionato a partir de acetato y/o alcohol.

En particular, el propionógeno utilizado según la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en *Clostridium propionicum*, *Pelobacter propionicus*, *Desulfobulbus propionicus*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophobacter pfennigii*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Smithella propionica*, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subespecie *thermosyntrophicum*, *Pelotomaculum thermopropionicum* y *Pelotomaculum schinkii*. Más en particular, el propionógeno utilizado según la presente invención puede ser *Clostridium neopropionicum*.

El propionógeno puede ser cualquier microorganismo eucariota o procariota que pueda modificarse genéticamente. Más en particular, dicho microorganismo puede ser una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacteria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Salmonella sp.*, *Brevibacteria sp.*, *Hypomononas sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, hongos y levaduras. Aún más en particular, dicho microorganismo puede seleccionarse de *Escherichia sp.* Por ejemplo, dicho microorganismo puede ser *Escherichia coli*. Dicho microorganismo puede ser un organismo genéticamente modificado que comprende una expresión aumentada con respecto a la célula de tipo natural de propionato CoA-transferasa (AJ276553) (E₁), lactoil-CoA deshidratasa (JN244651-3) (E₂) y acriloil-CoA reductasa (JN244654-6) (E₃). Kandasamy V. (2013) divulga un procedimiento para producir un organismo genético como tal. Kandasamy V. también divulga un medio para medir la expresión de las enzimas E₁, E₂ y E₃ para determinar si alguna de estas enzimas ha aumentado la expresión en relación con la célula de tipo silvestre.

Según la presente invención, el etanol y el acetato se producen exógenamente. Esto significa que el propionógeno que se utiliza según la presente invención puede no producir etanol y/o acetato por sí mismo. En particular, el medio acuoso que comprende el propionógeno ya comprende acetato y etanol antes de que el propionógeno comience a producir propanol y/o ácido propiónico. Más en particular, el propionógeno utiliza el etanol como material de partida en presencia de dióxido de carbono para producir propanol y/o ácido propiónico en presencia de acetato. El acetato no puede utilizarse en la producción de propanol y/o ácido propiónico. En particular, el acetato puede utilizarse para mejorar la selectividad de producción de propanol y/o ácido propiónico por el propionógeno. La presencia del acetato en la mezcla de reacción se mantiene así para estimular la producción de propanol y/o ácido propiónico y no de subproductos.

En lugar de esperar a que la célula produzca acetato endógeno, hay presencia de acetato producido exógenamente inicialmente en la etapa (b) en el medio acuoso. En particular, el término acetato y etanol "producidos exógenamente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a acetato y etanol producidos o purificados en un recipiente de reacción separado antes de poner en contacto el propionógeno con acetato y etanol producidos en la etapa (a), es decir, antes de la etapa (b). En otro ejemplo, el término acetato y etanol "producido exógenamente" comprende acetato y etanol producido por una célula bacteriana acetogénica antes de ponerse en contacto con el propionógeno en la etapa (b). En un ejemplo, el acetato y/o etanol se retiran del recipiente de reacción y después se ponen en contacto con el propionógeno en un segundo recipiente de reacción. En otro ejemplo, el propionógeno y las células acetogénicas se encuentran en el mismo recipiente de reacción. El acetato y/o el etanol pueden ser producidos por la célula acetogénica que se pone en contacto con al menos una fuente de carbono. En presencia de este acetato exógeno, el propionógeno convierte el etanol producido exógenamente en propanol y/o ácido propiónico. Más en particular, la concentración de acetato y etanol producidos exógenamente puede mantenerse en el medio acuoso en el valor o el intervalo de valores presente inicialmente mientras la reacción catalizada por el propionógeno en la etapa b) continúa.

El término "acetato", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere tanto al ácido acético como a sales del

5 mismo ($\text{CH}_3\text{-COO-}$), que aparecen de forma inevitable porque, como se sabe en la técnica, los microorganismos trabajan en un ambiente acuoso y siempre hay un equilibrio entre la sal y el ácido presente. La relación de ácido acético molecular con respecto a acetato depende del pH del sistema, es decir, a una concentración constante de "acetato", cuanto menor sea el pH, mayor será la concentración de ácido acético molecular con respecto a la sal acetato.

10 La concentración del acetato en el medio acuoso es un aspecto crucial. En particular, la concentración de acetato es al menos de 1 g/l en el medio acuoso. Esta concentración se mantiene en el medio acuoso. En un ejemplo, la concentración de acetato se mantiene a la concentración mencionada anteriormente, por ejemplo al menos por encima de 1,5 g/l, 2 g/l, 2,5 g/l, 3 g/l, 3,5 g/l, 4 g/l, 4,5 g/l, 5 g/l, 5,5 g/l, 6 g/l, 6,5 g/l, 7 g/l, 7,5 g/l, 8 g/l, 8,5 g/l, 9 g/l, 9,5 g/l o 10 g/l. En particular, la concentración de acetato puede mantenerse de 1 g/l a 10 g/l en el medio acuoso. Más en particular, la concentración de acetato se mantiene de 1,5 g/l a 7 g/l en el medio acuoso. Aún más en particular, la concentración de acetato puede mantenerse a aproximadamente 2 g/l en el medio acuoso.

15 El término 'aproximadamente', tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una variación dentro del 20 por ciento. En particular, el término "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a +/- 20%, más en particular +/- 10%, incluso más en particular +/- 5%, de una medida o valor dado.

20 Un experto será capaz de mantener la concentración de acetato al nivel deseado mediante procedimientos conocidos en la técnica. En particular, el experto medirá regularmente la concentración de acetato en el medio acuoso y ajustará la concentración de acetato en consecuencia añadiendo una concentración mayor o menor de acetato al medio. En un ejemplo, el acetato se puede medir utilizando RMN. En particular, la concentración de acetato se puede medir usando espectroscopía de RMN de H^1 semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se puede utilizar el trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP). En otro ejemplo, la concentración de acetato se puede medir usando un kit de enzimas (número de artículo: 10148261035) de R-Biopharm siguiendo las instrucciones del fabricante. En un ejemplo, el acetato se puede añadir al medio acuoso en un flujo continuo separado de la alimentación continua del medio acuoso. En otro ejemplo, el acetato puede ser parte del medio de cultivo que se está cargando. En particular, el acetato se puede alimentar al medio acuoso como parte de la alimentación de nutrientes o por separado. Cualquiera que sea la vía que se tome para alimentar el acetato al medio acuoso, un experto será consciente de los medios para mantener la concentración de acetato en el medio acuoso. En un ejemplo, la concentración de acetato en el medio puede mantenerse cargando el acetato cada aproximadamente 20 horas de fermentación. En otro ejemplo, la carga de acetato a medio puede tener lugar cada 5, 10, 15, 20, 25, 30 horas desde el comienzo del proceso de cultivo y/o fermentación. En otro ejemplo puede no ser necesario cargar necesariamente acetato, ya que puede no utilizarse acetato en el procedimiento de producción de propanol y/o ácido propiónico.

35 La concentración de acetato en el medio acuoso se mantiene al menos a 1 g/l durante el 100% del tiempo de reacción y puede mantenerse a concentraciones más altas durante el 80% del periodo de reacción. En otro ejemplo, las concentraciones más altas de acetato pueden mantenerse durante el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% o 100% del tiempo de reacción. A este respecto, el "tiempo de reacción" se refiere al periodo durante el cual tiene lugar un proceso. En particular, el tiempo de reacción se refiere al periodo de tiempo desde que una reacción comienza hasta que la reacción finaliza y/o se completa, es decir, cuando se utiliza el sustrato. El sustrato es etanol y dióxido de carbono, y la reacción se completa cuando el etanol en el fermentador se agota y la reacción se detiene y no se alimenta más etanol y dióxido de carbono al fermentador. Por lo tanto, el tiempo de reacción se refiere al periodo desde el momento en que comienza la fermentación (es decir, cuando el etanol y el dióxido de carbono entran en contacto por lo menos con un propionógeno en un fermentador en condiciones de fermentación adecuadas) hasta el momento en que finaliza la fermentación (es decir, cuando no hay más etanol y dióxido de carbono en el fermentador y/o cuando existe otro factor limitante en el fermentador que impide que la reacción continúe). En un ejemplo, el periodo de reacción puede ser de 24 horas, 42 horas, 72 horas o 96 horas. En otro ejemplo, el periodo de reacción puede ser de 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 97 horas.

50 El acetato procedente de la mezcla tras la etapa (b) puede reciclarse. En particular, esto significa que se puede permitir que el propanol y/o el ácido propiónico formados en la etapa (b) se acumulen y después se separen por medios conocidos en la técnica. El acetato puede mantenerse así en la mezcla de reacción y reciclarse. El propanol y/o el ácido propiónico formados en la etapa (b) pueden eliminarse en modo discontinuo o en modo continuo. En el último caso, el propanol y/o el ácido propiónico formado se eliminan en continuo mediante una etapa de separación conocida en la técnica.

60 El experto en la técnica está familiarizado con los procedimientos que pueden utilizarse para separar el propanol y/o el ácido propiónico a partir de un medio acuoso que comprende acetato y/o etanol. Por ejemplo, la extracción se puede realizar utilizando un disolvente orgánico hidrófobo, destilación o similares. Un experto puede identificar fácilmente los medios más adecuados para extraer propanol y/o ácido propiónico por medio de un proceso sencillo de ensayo y error. En particular, los procedimientos pueden incluir el divulgado por Keshav, A., 2009 y Galaction, A.-I., 2012.

65 El procedimiento según la presente invención puede comprender una etapa anterior para producir etanol y/o acetato, tal como se define en la reivindicación 8. El etanol y/o el acetato pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica para introducir exógenamente estos dos compuestos en al menos un propionógeno para la producción de

propanol y/o ácido propiónico. En particular, se puede utilizar un procedimiento biotecnológico para la producción de etanol y/o acetato. Más en particular, se puede producir etanol y/o acetato (a) poniendo en contacto al menos una bacteria acetogénica con una fuente de carbono. La fuente de carbono puede comprender dióxido de carbono y/o monóxido de carbono.

5 Para la etapa (a), con respecto a la fuente de sustratos que comprenden dióxido de carbono y/o monóxido de carbono, un experto entenderá que existen muchas fuentes posibles para el suministro de CO y/o CO₂ como fuente de carbono. Se puede observar que, en la práctica, como fuente de carbono, se puede utilizar cualquier gas o cualquier mezcla de gases que pueda suministrar a los microorganismos cantidades suficientes de carbono, de modo que se pueda formar acetato y/o etanol a partir de la fuente de CO y/o CO₂.

10 En general, para la etapa (a), la célula que se va a utilizar se refiere a cualquier microorganismo según la presente invención, la fuente de carbono comprende al menos el 50% en peso, al menos el 70% en peso, particularmente al menos el 90% en peso de CO₂ y/o CO, refiriéndose los porcentajes (%) en peso a todas las fuentes de carbono que están disponibles para la célula según cualquier aspecto de la presente invención. Se puede proporcionar la fuente de material de carbono.

20 Los ejemplos de fuentes de carbono en forma de gas incluyen gases de escape tales como gas de síntesis, gas de combustión y gases de refinería de petróleo producidos por fermentación de levadura o fermentación clostridial. Estos gases de escape se forman a partir de la gasificación de materiales que contienen celulosa o la gasificación de carbón. En un ejemplo, estos gases de escape pueden producirse no necesariamente como subproductos de otros procesos, sino que pueden producirse específicamente para su uso con un cultivo mixto.

25 Según la presente invención, la fuente de carbono de la etapa (a) puede ser gas de síntesis. El gas de síntesis se puede producir, por ejemplo, como un subproducto de la gasificación del carbón. En consecuencia, el microorganismo será capaz de convertir una sustancia que es un producto de desecho en un recurso valioso.

30 En otro ejemplo, el gas de síntesis puede ser un subproducto de la gasificación de materias primas agrícolas ampliamente disponibles y de bajo coste para su uso con el cultivo mixto según el presente procedimiento.

35 Existen numerosos ejemplos de materias primas que se pueden convertir en gas de síntesis, ya que casi todas las formas de vegetación se pueden utilizar para este propósito. En particular, las materias primas se seleccionan del grupo que consiste en pastos perennes tales como miscanto, residuos de maíz, desechos de procesamiento tales como serrín y similares.

40 En general, el gas de síntesis puede obtenerse en un aparato de gasificación de biomasa seca, principalmente mediante pirólisis, oxidación parcial y reformado con vapor, en el que los productos primarios del gas de síntesis son CO, H₂ y CO₂. El gas de síntesis también puede ser un producto de electrólisis. En particular, el gas de síntesis puede ser un producto de la electrólisis de CO₂ y/o agua. Un experto será consciente de las condiciones adecuadas para llevar a cabo la electrólisis de CO₂ y/o agua para producir gas de síntesis que comprende CO y/o H₂ en la cantidad deseada.

45 Por lo general, una parte del gas de síntesis obtenido del proceso de gasificación se procesa en primer lugar para optimizar los rendimientos del producto y evitar la formación de alquitrán. El craqueo del alquitrán no deseado y el CO en el gas de síntesis se puede llevar a cabo utilizando cal y/o dolomita. Estos procesos se describen en detalle por, por ejemplo, Reed, 1981.

50 Se pueden utilizar mezclas de fuentes como fuente de carbono. Según la presente invención, se puede suministrar un agente reductor, por ejemplo hidrógeno, junto con la fuente de carbono. En particular, este hidrógeno se puede suministrar cuando se suministran y/o utilizan C y/o CO₂. En un ejemplo, el gas hidrógeno es parte del gas de síntesis presente según la presente invención. En otro ejemplo, en el que el gas hidrógeno del gas de síntesis es insuficiente para el procedimiento de la presente invención, se puede suministrar gas hidrógeno adicional.

55 El término "bacterias acetogénicas", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un microorganismo que puede realizar la ruta de Wood-Ljungdahl y, por lo tanto, es capaz de convertir CO, CO₂ y/o hidrógeno a acetato. Estos microorganismos incluyen microorganismos que en su forma de tipo silvestre no poseen una ruta de Wood-Ljungdahl, pero han adquirido este rasgo como resultado de la modificación genética. Dichos microorganismos incluyen, pero sin limitación, células de *E. coli*. Estos microorganismos también pueden conocerse como bacterias carboxidotróficas. Actualmente, se conocen 21 géneros diferentes de bacterias acetogénicas en la técnica (Drake et al., 2006), y estos también pueden incluir algunos *clostridia* (Drake y Kusel, 2005). Estas bacterias pueden utilizar dióxido de carbono o monóxido de carbono como fuente de carbono con hidrógeno como fuente de energía (Wood, 1991). Además, también se pueden utilizar alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, así como numerosas hexosas, en la etapa (a) como fuente de carbono (Drake et al., 2004). La ruta reductora que conduce a la formación de acetato se conoce como ruta acetil-CoA o de Wood-Ljungdahl.

65 En particular, las bacterias acetogénicas pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Acetoanaerobium notera*

(ATCC 35199), *Acetonema longum* (DSM 6540), *Acetobacterium carbinolicum* (DSM 2925), *Acetobacterium malicum* (DSM 4132), *Acetobacterium* especie N° 446 (Morinaga et al., 1990, J. Biotechnol., Vol. 14, p. 187-194), *Acetobacterium wieringae* (DSM 1911), *Acetobacterium woodii* (DSM 1030), *Alkalibaculum bacchi* (DSM 22112), *Archaeoglobus fulgidus* (DSM 4304), *Blautia producta* (DSM 2950, anteriormente *Ruminococcus productus*, anteriormente *Peptostreptococcus productus*), *Butyribacterium methylotrophicum* (DSM 3468), *Clostridium aceticum* (DSM 1496), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061, DSM 19630 y DSM 23693), *Clostridium carboxidivorans* (DSM 15243), *Clostridium coskatii* (ATCC N° PTA-10522), *Clostridium drakei* (ATCC BA-623), *Clostridium formicoaceticum* (DSM 92), *Clostridium glycolicum* (DSM 1288), *Clostridium ljungdahlii* (DSM 13528), *Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988), *Clostridium ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380), *Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989), *Clostridium mayombeii* (DSM 6539), *Clostridium methoxybenzovorans* (DSM 12182), *Clostridium ragsdalei* (DSM 15248), *Clostridium scatologenes* (DSM 757), *Clostridium* especie ATCC 29797 (Schmidt et al., 1986, Chem. Eng. Commun., Vol. 45, p. 61-73), *Desulfotomaculum kuznetsovii* (DSM 6115), *Desulfotomaculum thermoabezoicum* subesp. *thermosyntrophicum* (DSM 14055), *Eubacterium limosum* (DSM 20543), *Methanosarcina acetivorans* C2A (DSM 2834), *Moorella* sp. HUC22-1 (Sakai et al., 2004), *Moorella thermoacetica* (DSM 521, anteriormente *Clostridium thermoaceticum*), *Moorella thermoautotrophica* (DSM 1974), *Oxobacter pfennigii* (DSM 322), *Sporomusa aerivorans* (DSM 13326), *Sporomusa ovata* (DSM 2662), *Sporomusa silvacetica* (DSM 10669), *Sporomusa sphaeroides* (DSM 2875), *Sporomusa termitida* (DSM 4440) y *Thermoanaerobacter kivui* (DSM 2030, anteriormente *Acetogenium kivui*). Más en particular, puede utilizarse la cepa ATCC BAA-624 de *Clostridium carboxidivorans*. Aún más en particular, puede utilizarse la cepa bacteriana etiquetada "P7" y "P11" de *Clostridium carboxidivorans* tal como se describe, por ejemplo, en los documentos U.S. 2007/0275447 y U.S. 2008/0057554.

Otra bacteria particularmente adecuada puede ser *Clostridium ljungdahlii*. En particular, pueden utilizarse cepas seleccionadas del grupo que consiste en *Clostridium ljungdahlii* PETC, *Clostridium ljungdahlii* ERI2, *Clostridium ljungdahlii* COL y *Clostridium ljungdahlii* O-52 en la conversión de gas de síntesis a ácido hexanoico. Estas cepas, por ejemplo, se describen en los documentos WO 98/00558, WO 00/68407, ATCC 49587, ATCC 55988 y ATCC 55989. Las bacterias acetogénicas primera y segunda utilizadas según la presente invención pueden ser bacterias iguales o diferentes. Por ejemplo, en una mezcla de reacción, las primeras bacterias acetogénicas pueden ser *Clostridium ljungdahlii* en la fase logarítmica y la segunda bacteria acetogénica puede ser *Clostridium ljungdahlii* en la fase estacionaria. En otro ejemplo, en la mezcla de reacción, las primeras bacterias acetogénicas pueden ser *Clostridium ljungdahlii* en la fase logarítmica y la segunda bacteria acetogénica puede ser *Clostridium carboxidivorans* en la fase estacionaria.

En la mezcla de reacción según la presente invención, puede haber presencia de oxígeno (es decir, se utilizan condiciones aeróbicas). Es ventajoso incorporar O₂ en la mezcla de reacción y/o el flujo de gas que se suministra a la mezcla de reacción, ya que la mayor parte de los gases residuales, incluido el gas de síntesis, comprenden oxígeno en pequeñas o grandes cantidades. Es difícil y costoso eliminar este oxígeno antes de utilizar el gas de síntesis como fuente de carbono para la producción de alcoholes superiores. El procedimiento según la presente invención permite la producción de al menos propanol sin la necesidad de eliminar en primer lugar cualquier rastro de oxígeno de la fuente de carbono. Esto permite ahorrar tiempo y dinero.

El término "poner en contacto", tal como se utiliza en el presente documento, significa ocasionar el contacto directo entre la célula y el medio que comprende la fuente de carbono en la etapa (a) y el contacto directo entre el propionógeno y el acetato y el etanol de la etapa (a) en la etapa (b). Por ejemplo, la célula y el medio que comprende la fuente de carbono pueden estar en compartimentos diferentes en la etapa (a). En particular, la fuente de carbono puede estar en un estado gaseoso y añadirse al medio que comprende las células según el procedimiento de la presente invención.

En particular, el medio acuoso puede comprender las células y una fuente de carbono que comprende CO y/o CO₂ para que se lleve a cabo la etapa (a). Más en particular, la fuente de carbono que comprende CO y/o CO₂ se proporciona al medio acuoso que comprende las células en un flujo continuo de gas. Aún más en particular, el flujo continuo de gas comprende gas de síntesis. Estos gases pueden suministrarse, por ejemplo, utilizando boquillas que se abren en el medio acuoso, fritas, membranas dentro de la tubería que suministran el gas al medio acuoso y similar.

La eficacia general, la productividad del alcohol y/o la captura general de carbono del procedimiento de la presente invención pueden depender de la estequiometría del CO₂, el CO y el H₂ en el flujo continuo de gas. Los flujos continuos de gas aplicados pueden ser de composición CO₂ y H₂. En particular, en el flujo continuo de gas, el intervalo de concentración de CO₂ puede ser de aproximadamente el 10-50%, en particular el 3% en peso y el de H₂ se encontraría dentro del intervalo del 44% al 84%, en particular, del 64 al 66,04% en peso. En otro ejemplo, el flujo continuo de gas también puede comprender gases inertes tales como N₂, hasta una concentración de N₂ del 50% en peso.

Según la presente invención, las bacterias propionogénicas y/o acetogénicas pueden ser un microorganismo modificado genéticamente. La célula o el microorganismo modificado genéticamente puede ser genéticamente diferente de la célula o el microorganismo de tipo silvestre. La diferencia genética entre el microorganismo modificado genéticamente según cualquier aspecto de la presente invención y el microorganismo de tipo silvestre puede deberse a la presencia de un gen completo, aminoácido, nucleótido, etc. en el microorganismo modificado genéticamente que puede estar ausente en el tipo silvestre microorganismo. En un ejemplo, el microorganismo modificado genéticamente

según la presente invención puede comprender enzimas que permiten que el microorganismo produzca propanol y/o ácido propiónico. El microorganismo de tipo silvestre con respecto al microorganismo modificado genéticamente según la presente invención puede tener una actividad nula o no detectable de las enzimas que permiten que el microorganismo modificado genéticamente produzca propanol y/o ácido propiónico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "microorganismo modificado genéticamente" puede utilizarse indistintamente con el término "célula modificada genéticamente". La modificación genética según la presente invención puede llevarse a cabo en la célula del microorganismo.

La frase "tipo silvestre", tal como se utiliza en el presente documento junto con una célula o un microorganismo, puede denotar una célula con una composición genómica que se encuentra en una forma tal como se observa de forma natural en la naturaleza. El término puede aplicarse tanto a la célula entera como a genes individuales. Por lo tanto, el término "tipo silvestre" no incluye las células o los genes en los que las secuencias génicas han sido alteradas al menos parcialmente por el hombre utilizando procedimientos recombinantes.

Un experto podría utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para modificar genéticamente una célula o un microorganismo. Según la presente invención, la célula modificada genéticamente puede modificarse genéticamente de forma que en un intervalo de tiempo definido, dentro de un periodo de 2 horas, en particular dentro de un periodo de 8 horas o 24 horas, esta forme al menos dos veces, especialmente al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o al menos 10000 veces más propanol y/o ácido propiónico que la célula de tipo silvestre. El aumento en la formación del producto puede determinarse, por ejemplo, cultivando la célula según la presente invención y la célula de tipo silvestre, cada una por separado en las mismas condiciones (misma densidad celular, mismo medio nutritivo, mismas condiciones de cultivo) durante un intervalo de tiempo especificado en un medio nutritivo adecuado y después determinar la cantidad de producto diana (propanol y/o ácido propiónico) en el medio nutritivo.

La frase "aumento en la actividad de una enzima", tal como se utiliza en el presente documento, debe entenderse como un aumento en la actividad intracelular. Básicamente, se puede lograr un aumento en la actividad enzimática aumentando el número de copias de la secuencia génica o las secuencias génicas que codifican la enzima, utilizando un promotor fuerte o empleando un gen o alelo que codifica una enzima correspondiente con mayor actividad y opcionalmente mediante una combinación de estas medidas. Las células genéticamente modificadas utilizadas en el procedimiento según la invención se producen, por ejemplo, mediante transformación, transducción, conjugación o una combinación de estos procedimientos con un vector que contiene el gen deseado, un alelo de este gen o partes del mismo y un vector que posibilita la expresión del gen. La expresión heteróloga se logra en particular mediante la integración del gen o de los alelos en el cromosoma de la célula o en un vector de replicación extracromosómica. De forma similar, una reducción en la actividad de una enzima se refiere a una reducción en la actividad intracelular. En un ejemplo, la expresión aumentada de una enzima según la presente invención puede ser el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% superior con respecto a la expresión de la enzima en la célula de tipo silvestre. De forma similar, la reducción en la expresión de una enzima según la presente invención puede ser el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% inferior con respecto a la expresión de la enzima en la célula de tipo silvestre.

El medio de cultivo que se va a utilizar debe ser adecuado para los requisitos de las cepas particulares. Las descripciones de los medios de cultivo para diversos microorganismos se proporcionan en el "Manual of Methods for General Bacteriology".

Todos los porcentajes (%) son, a menos que se especifique lo contrario, porcentajes en masa.

Un experto será consciente de las otras condiciones necesarias para llevar a cabo el procedimiento según la presente invención. En particular, las condiciones en el recipiente (por ejemplo, fermentador) pueden variar según las bacterias acetogénicas y/o el propionógeno utilizado. La variación de las condiciones para que sean adecuadas para el funcionamiento óptimo de los microorganismos se encuentra dentro del conocimiento del experto.

En un ejemplo, el procedimiento según la presente invención puede llevarse a cabo en un medio acuoso con un pH entre 5 y 8, 5,5 y 7. La presión puede encontrarse entre 1 y 10 bar (= 10^5 - 10^6 Pa).

Un experto será consciente de que puede ser necesario controlar la composición y los caudales de las corrientes. El control de la composición de la corriente se puede lograr variando las proporciones de las corrientes constituyentes para lograr una composición objetivo o deseable. La composición y el caudal de la corriente se pueden controlar por cualquier medio conocido en la técnica. En un ejemplo, el sistema está adaptado para controlar continuamente los caudales y las composiciones de las corrientes y combinarlas para producir una única corriente de sustrato mezclado en un flujo continuo de gas de composición óptima, y medios para hacer pasar la corriente de sustrato optimizada a la célula según cualquier aspecto de la presente invención.

Los microorganismos que convierten CO₂ y/o CO a acetato y/o etanol en la etapa (a) tal como se definen en la reivindicación 6, en particular acetato, así como los procedimientos y condiciones de proceso apropiados para llevar a cabo esta reacción metabólica son bien conocidos en la técnica. Dichos procesos se describen, por ejemplo, en los

documentos WO9800558, WO2000014052 y WO2010115054.

El término "una solución acuosa" o "medio" comprende cualquier solución que comprende agua, principalmente agua como disolvente, que puede utilizarse para mantener la célula según la presente invención, al menos temporalmente, en un estado metabólicamente activo y/o viable y comprende, si es necesario, cualquier sustrato adicional. El experto en la técnica está familiarizado con la preparación de numerosas soluciones acuosas, generalmente denominadas medios, que pueden utilizarse para mantener células de la invención, por ejemplo, medio LB en el caso de *E. coli*, pudiendo utilizarse medio ATCC1754 en el caso de *C. ljungdahlii*. Es ventajoso utilizar como solución acuosa un medio mínimo, es decir un medio de composición razonablemente sencilla que comprenda solo el conjunto mínimo de sales y nutrientes indispensables para mantener la célula en un estado metabólicamente activo y/o viable, a diferencia de con los medios complejos, para evitar la contaminación innecesaria de los productos con productos secundarios no deseados. Por ejemplo, puede utilizarse medio M9 como medio mínimo. Las células se incuban con la fuente de carbono lo suficientemente grande como para producir el producto deseado, 3HB y variantes del mismo. Por ejemplo durante al menos 1, 2, 4, 5, 10 o 20 horas. La temperatura elegida debe ser tal que las células según la presente invención permanezcan catalíticamente competentes y/o metabólicamente activas, por ejemplo de 10 a 42 °C, preferentemente de 30 a 40 °C, en particular, de 32 a 38 °C en caso de que la célula sea una célula de *C. ljungdahlii*.

En un ejemplo, las etapas (a) y (b) pueden llevarse a cabo en un único recipiente. Esto permite que se produzca la acumulación de propanol y/o ácido propiónico y que se utilicen menos medios, haciendo que la reacción sea más rentable. El etanol producido en la etapa (a) puede utilizarse en la producción de propanol y/o ácido propiónico y el acetato producido en la etapa (a) puede utilizarse para mejorar la selectividad de la reacción.

En otro ejemplo, la etapa (a) y la etapa (b) pueden llevarse a cabo en dos recipientes diferentes. En un ejemplo, la etapa (a) puede llevarse a cabo en el fermentador 1 en el que las bacterias acetogénicas entran en contacto con la fuente de carbono para producir acetato y/o etanol. El etanol y/o el acetato pueden ponerse en contacto con un propionógeno en el fermentador 2 para producir propanol y/o ácido propiónico. El propanol y/o el ácido propiónico se pueden extraer y el sustrato de carbono restante se puede volver a alimentar al fermentador 1. Se puede crear un ciclo en el que el acetato y/o etanol producidos en el fermentador 1 pueden alimentarse regularmente al fermentador 2, el etanol en el fermentador 2 puede convertirse en propanol y/o ácido propiónico y la fuente de carbono sin reaccionar presente en el fermentador 2 retroalimentarse al fermentador 1.

En un ejemplo, las bacterias acetogénicas pueden estar presentes en un primer fermentador y un propionógeno en un segundo fermentador. En el fermentador 1, las bacterias acetogénicas entran en contacto con la fuente de carbono para producir acetato y/o etanol. El etanol y/o el acetato pueden ponerse en contacto con un propionógeno en el fermentador 2 para producir al menos propanol y/o ácido propiónico. Se puede crear un ciclo en el que el acetato y/o etanol producidos en el fermentador 1 pueden alimentarse regularmente al fermentador 2 y el acetato y/o etanol puedan convertirse en al menos propanol y/o ácido propiónico en el fermentador 2. Se puede añadir oxígeno al fermentador 2 para permitir que el propionógeno convierta el acetato en al menos uno de propanol y/o ácido propiónico.

De forma similar, en el fermentador 1, las bacterias acetogénicas pueden entrar en contacto con la fuente de carbono que comprende CO para producir acetato y/o etanol. El etanol y/o el acetato pueden ponerse en contacto con un propionógeno en el fermentador 2 para producir propanol y/o ácido propiónico. Se puede crear un ciclo en el que el acetato y/o etanol producidos en el fermentador 1 pueden alimentarse regularmente al fermentador 2 y el acetato y/o etanol en el fermentador 2 pueden convertirse en propanol y/o ácido propiónico. El CO alimentado al fermentador 1 puede transferirse al fermentador 2 junto con el acetato y/o el etanol. No se necesita un procedimiento de extracción especial entre los dos fermentadores. En otro ejemplo, el medio se recicla entre los fermentadores 1 y 2. Por lo tanto, el propanol y/o el ácido propiónico producidos en el fermentador 2 se pueden volver a alimentar al fermentador 1 para acumular el propanol, el ácido propiónico y/o sus derivados producidos según la presente invención en los fermentadores.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de ácido propiónico y propanol con Clostridium neopropionicum sobre acetato

Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico y propanol, se cultivó la bacteria *Clostridium neopropionicum* en medio mineral con etanol, acetato y una atmósfera de gas con dióxido de carbono. Todas las etapas de cultivo se llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo. Para el primer precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon 5 ml de un criocultivo congelado a 2 x 100 ml de medio DSMZ318 (pH 7,4; 0,61 g/l de NaCl, 0,047 g/l de MgCl₂, 0,30 g/l de KH₂PO₄, 1,00 g/l de NH₄Cl, 0,081 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de peptona tripticasa BBL, 4 g/l de KHCO₃, 1,026 g/l de etanol, 0,5 mg/l de resazurina, 128 mg/l de ácido nitrilotriacético, 135 mg/l de FeCl₃ x 6 H₂O, 1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,24 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 1 mg/l de ZnCl₂, 0,25 mg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 0,1 mg/l de H₃BO₃, 0,24 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,26 mg/l de Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,02 mg/l de biotina, 0,02 mg/l de ácido fólico, 0,1 mg/l de piridoxina-HCl, 0,05 mg/l de

- tiamina-HCl x H₂O, 0,05 mg/l de riboflavina, 0,05 mg/l de ácido nicotínico, 0,05 mg/l de D-pantotenato de Ca, 1 µg/l de vitamina B12, 0,05 mg/l de p-aminobenzoato, 0,05 mg/l de ácido lipoico, 0,25 g/l de cisteína-HCl x H₂O) en un frasco de 250 ml y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. El cultivo se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 24 h hasta una DO_{600nm} > 0,15.
- 5 Para un segundo precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 3 x 200 ml de medio DSMZ318 nuevo en un frasco de 500 ml hasta una DO_{600nm} de 0,03 y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. Este cultivo en crecimiento se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 22 h hasta una DO_{600nm} > 0,23.
- 10 Para el cultivo principal, se añadieron tantas células centrifugadas procedentes del segundo precultivo de *C. neopropionicum* como fueran necesarias para una DO_{600nm} de 0,2 a 200 ml de medio mineral LM33 nuevo (pH = 6,8, 10 g/l de etanol, 1 g/l de NaOH, 0,5 g/l de MgCl₂, 0,21 g/l de NaCl, 0,135 g/l de CaCl₂ X 2 H₂O, 2,65 g/l de NaH₂PO₄ X 2 H₂O, 0,5 g/l de KCl, 2,5 g/l de NH₄Cl, 15 mg/l de ácido nitrilotriacético, 30 mg/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 5 mg/l de MnSO₄ x H₂O, 1 mg/l de FeSO₄ x 7 H₂O, 8 mg/l de Fe(SO₄)₂(NH₄)₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 200 µg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 200 µg/l de KAl(SO₄)₂ x 12 H₂O, 3 mg/l de H₃BO₃, 300 µg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 200 µg/l de Na₂SeO₃, 200 µg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 200 µg/l de Na₂WO₄ x 6 H₂O, 200 µg/l de d-biotina, 200 µg/l de ácido fólico, 100 µg/l de piridoxina-HCl, 500 µg/l de tiamina-HCl; 500 µg/l de riboflavina; 500 µg/l de ácido nicotínico; 500 µg/l de pantotenato de calcio; 500 µg/l de vitamina B₁₂; 500 µg/l de p-aminobenzoato; 500 µg/l de ácido lipoico, 10 mg/l de FeCl₃, aireado durante 30 minutos con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂) con 1,39 g/l de acetato de sodio adicional. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 500 ml a 30 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 113 h. El pH se mantuvo a 6,8 mediante la adición automática de solución de NaOH (100 g/l).
- 20
- 25 Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).
- 30 Durante el cultivo, la concentración de propionato aumentó de 0,05 g/l a 3,20 g/l, para propanol de 0,01 a 0,26 g/l, para butirato de 0,01 a 0,33 g/l y para lactato de 0,00 g/l a 0,13 g/l. La concentración de etanol disminuyó de 10,1 g/l a 5,2 g/l durante este tiempo. La selectividad de la formación de propionato/propanol fue de aproximadamente el 88,0%.

Ejemplo 2

- 35 *Producción de ácido propiónico y propanol con Clostridium neopropionicum sobre acetato*

Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico y propanol, se cultivó la bacteria *Clostridium neopropionicum* en medio mineral con etanol, acetato y una atmósfera de gas con dióxido de carbono.

40 Todos las etapas de cultivo se llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo. Para el primer precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon 5 ml de un criocultivo congelado a 2 x 100 ml de medio DSMZ318 (pH 7,4; 0,61 g/l de NaCl, 0,047 g/l de MgCl₂, 0,30 g/l de KH₂PO₄, 1,00 g/l de NH₄Cl, 0,081 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de peptona tripticasa BBL, 4 g/l de KHCO₃, 1,026 g/l de etanol, 0,5 mg/l de resazurina, 128 mg/l de ácido nitrilotriacético, 135 mg/l de FeCl₃ x 6 H₂O, 1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,24 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 1 mg/l de ZnCl₂, 0,25 mg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 0,1 mg/l de H₃BO₃, 0,24 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,26 mg/l de Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,02 mg/l de biotina, 0,02 mg/l de ácido fólico, 0,1 mg/l de piridoxina-HCl, 0,05 mg/l de tiamina-HCl x H₂O, 0,05 mg/l de riboflavina, 0,05 mg/l de ácido nicotínico, 0,05 mg/l de D-pantotenato de Ca, 1 µg/l de vitamina B12, 0,05 mg/l de p-aminobenzoato, 0,05 mg/l de ácido lipoico, 0,25 g/l de cisteína-HCl x H₂O) en un frasco de 250 ml y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. El cultivo se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 24 h hasta una DO_{600nm} > 0,15.

50 Para un segundo precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 3 x 200 ml de medio DSMZ318 nuevo en un frasco de 500 ml hasta una DO_{600nm} de 0,03 y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. Este cultivo en crecimiento se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 22 h hasta una DO_{600nm} > 0,23.

55 Para el cultivo principal, se añadieron tantas células centrifugadas del segundo precultivo de *C. neopropionicum* como fueran necesarias para una DO_{600nm} de 0,2 a 200 ml de medio mineral LM33 nuevo (pH = 6,8; 10 g/l de etanol, 1 g/l de NaOH, 0,5 g/l de MgCl₂, 0,21 g/l de NaCl, 0,135 g/l de CaCl₂ X 2 H₂O, 2,65 g/l de NaH₂PO₄ X 2 H₂O, 0,5 g/l de KCl, 2,5 g/l de NH₄Cl, 15 mg/l de ácido nitrilotriacético, 30 mg/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 5 mg/l de MnSO₄ x H₂O, 1 mg/l de FeSO₄ x 7 H₂O, 8 mg/l de Fe(SO₄)₂(NH₄)₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 200 µg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 200 µg/l de KAl(SO₄)₂ x 12 H₂O, 3 mg/l de H₃BO₃, 300 µg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 200 µg/l de Na₂SeO₃, 200 µg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 200 µg/l de Na₂WO₄ x 6 H₂O, 200 µg/l de d-biotina, 200 µg/l de ácido fólico, 100 µg/l de piridoxina-HCl, 500 µg/l de tiamina-HCl, 500 µg/l de riboflavina, 500 µg/l de ácido nicotínico, 500 µg/l de pantotenato de calcio, 500 µg/l de vitamina B₁₂, 500 µg/l de p-aminobenzoato, 500 µg/l de ácido lipoico, 10 mg/l de FeCl₃, aireado durante 30 minutos con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂) con 6,95 g/l de acetato de sodio

60

65

adicionales. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 500 ml a 30 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 113 h. El pH se mantuvo a 6,8 mediante la adición automática de solución de NaOH (100 g/l).

5 Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).

10 Durante el cultivo la concentración de propionato aumentó de 0,05 g/l a 3,35 g/l, para propanol de 0,01 a 0,19 g/l, para butirato de 0,00 a 0,19 g/l y para lactato de 0,00 g/l a 0,16 g/l. La concentración de etanol disminuyó de 10,0 g/l a 5,4 g/l durante este tiempo. La selectividad de la formación de propionato/propanol fue de aproximadamente el 91,0%.

Ejemplo 3

15 *Producción de ácido propiónico y propanol con Clostridium neopropionicum*

Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico y propanol, se cultivó la bacteria *Clostridium neopropionicum* en medio mineral con etanol y una atmósfera de gas con dióxido de carbono. Todas las etapas de cultivo se llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo.

20 Para el primer precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon 5 ml de un criocultivo congelado a 2 x 100 ml de medio DSMZ318 (pH 7,4; 0,61 g/l de NaCl, 0,047 g/l de MgCl₂, 0,30 g/l de KH₂PO₄, 1,00 g/l de NH₄Cl, 0,081 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de peptona tripticasa BBL, 4 g/l de KHCO₃, 1,026 g/l de etanol, 0,5 mg/l de resazurina, 128 mg/l de ácido nitrilotriacético, 135 mg/l de FeCl₃ x 6 H₂O, 1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,24 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 1 mg/l de ZnCl₂, 0,25 mg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 0,1 mg/l de H₃BO₃, 0,24 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,26 mg/l de Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,02 mg/l de biotina, 0,02 mg/l de ácido fólico, 0,1 mg/l de piridoxina-HCl, 0,05 mg/l de tiamina-HCl x H₂O, 0,05 mg/l de riboflavina, 0,05 mg/l de ácido nicotínico, 0,05 mg/l de D-pantotenato de Ca, 1 µg/l de vitamina B12, 0,05 mg/l de p-aminobenzoato, 0,05 mg/l de ácido lipoico, 0,25 g/l de cisteína-HCl x H₂O) en un frasco de 250 ml y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. El cultivo se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 24 h hasta una DO_{600nm} > 0,15. Para un segundo precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 3 x 200 ml de medio DSMZ318 nuevo en un frasco de 500 ml hasta una DO_{600nm} de 0,03 y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. Este cultivo en crecimiento se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 22 h hasta una DO_{600nm} > 0,23.

35 Para el cultivo principal, se añadieron tantas células centrifugadas procedentes del segundo precultivo de *C. neopropionicum* que fueran necesarias para una DO_{600nm} de 0,2 a 200 ml de medio mineral LM33 nuevo (pH = 6,8; 10 g/l de etanol, 1 g/l de NaOH, 0,5 g/l de MgCl₂, 0,21 g/l de NaCl, 0,135 g/l de CaCl₂ X 2 H₂O, 2,65 g/l de NaH₂PO₄ X 2 H₂O, 0,5 g/l de KCl, 2,5 g/l de NH₄Cl, 15 mg/l de ácido nitrilotriacético, 30 mg/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 5 mg/l de MnSO₄ x H₂O, 1 mg/l de FeSO₄ x 7 H₂O, 8 mg/l de Fe(SO₄)₂(NH₄)₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 200 µg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 200 µg/l de KAl(SO₄)₂ x 12 H₂O, 3 mg/l de H₃BO₃, 300 µg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 200 µg/l de Na₂SeO₃, 200 µg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 200 µg/l de Na₂WO₄ x 6 H₂O, 200 µg/l de d-biotina, 200 µg/l de ácido fólico, 100 µg/l de piridoxina-HCl, 500 µg/l de tiamina-HCl, 500 µg/l de riboflavina, 500 µg/l de ácido nicotínico, 500 µg/l de pantotenato de calcio, 500 µg/l de vitamina B₁₂, 500 µg/l de p-aminobenzoato, 500 µg/l de ácido lipoico, 10 mg/l de FeCl₃, aireado durante 30 minutos con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂). El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 500 ml a 30 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 113 h. El pH se mantuvo a 6,8 mediante la adición automática de solución de NaOH (100 g/l).

40 Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).

55 Durante el cultivo, la concentración de propionato aumentó de 0,05 g/l a 2,45 g/l, para propanol de 0,01 a 0,45 g/l, para butirato de 0,01 a 0,32 g/l y para lactato de 0,00 g/l a 0,13 g/l. La concentración de etanol disminuyó de 10,5 g/l a 5,4 g/l durante este tiempo. La selectividad de la formación de propionato/propanol fue de aproximadamente el 86,5%.

60 **Ejemplo 4** (ejemplo comparativo)

Producción de propionato con Desulfobulbus propionicus

65 Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico, se cultivó la bacteria *Desulfobulbus propionicus* en medio con etanol y una atmósfera de gas con dióxido de carbono. Todas las etapas de cultivo se

llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo.

Para el primer precultivo de *Desulfobulbus propionicus* se inocularon 5 ml de una criosolución madre congelada a 50 ml de medio DSMZ194 (3 g/l de Na₂SO₄, 0,2 g/l de KH₂PO₄, 0,3 g/l de NH₄Cl, 1 g/l de NaCl, 0,4 g/l de MgCl₂ x 6 H₂O, 0,5 g/l de KCl, 0,15 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,5 mg/l de NaOH, 0,003 mg/l de Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,004 mg/l de Na₂WO₄ x 2 H₂O, 1 mg/l de resazurina, 5 g/l de NaHCO₃, 1,5 g/l de propionato de Na, 0,4 g/l de Na₂S x 9 H₂O, 2,8 mg/l de HCl, 1,5 mg/l de FeCl₂ x 4 H₂O, 0,07 mg/l de ZnCl₂ x 7 H₂O, 0,1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,006 mg/l de H₃BO₃, 0,19 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 0,002 mg/l de CuCl₂ x 6 H₂O, 0,024 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,036 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,02 mg/l de biotina, 0,02 mg/l de ácido fólico, 0,1 mg/l de piridoxina-HCl, 0,05 mg/l de tiamina-HCl, 0,05 mg/l de riboflavina, 0,05 mg/l de ácido nicotínico, 0,05 mg/l de D-pantotenato de Ca, 0,001 mg/l de vitamina B₁₂, 0,05 mg/l de ácido p-aminobenzoico, 0,05 mg/l de ácido lipoico), con 400 mg/l de Na₂S y 420 mg/l de KOH adicionales. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 250 ml a 37 °C, y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ en una cabina térmica sin agitación durante 72 h hasta una DO_{600nm} de 0,18.

Para el segundo precultivo se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 2 x 100 ml de medio DSMZ194 con 400 mg/l de Na₂S y 420 mg/l de KOH adicionales hasta una DO_{600nm} de 0,038 y 0,034, respectivamente. El cultivo se realizó en 2 frascos de vidrio resistentes a la presión de 250 ml a 37 °C y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ durante 47 h, uno en una cabina térmica sin agitar, el otro en un agitador de baño de agua abierto a 100 rpm hasta una DO_{600nm} de 0,2 y 0,18, respectivamente.

Para el cultivo principal se inocularon células centrifugadas de ambos segundos precultivos a 100 ml de medio ATCC1754 (pH = 6,0; 20 g/l de MES, 1 g/l de extracto de levadura, 0,8 g/l de NaCl, 1 g/l de NH₄Cl, 0,1 g/l de KCl, 0,1 g/l de KH₂PO₄, 0,2 g/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,02 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 20 mg/l de ácido nitrotriacético, 10 mg/l de MnSO₄ x H₂O, 8 mg/l de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 mg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 0,2 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,2 mg/l de Na₂SeO₄, 0,2 mg/l de Na₂WO₄ x 2 H₂O, 20 µg/l de d-biotina, 20 µg/l de ácido fólico, 100 µg/l de piridoxina-HCl, 50 µg/l de tiamina-HCl x H₂O, 50 µg/l de riboflavina, 50 µg/l de ácido nicotínico, 50 µg/l de pantotenato de calcio, 1 µg/l de vitamina B₁₂, 50 µg/l de p-aminobenzoato, 50 µg/l de ácido lipoico, aproximadamente 67,5 mg/l de NaOH), con 400 mg/l de clorhidrato de L-cisteína, 5 ml/l de etanol y 5,74 g/l de KOH adicionales, a una DO_{600nm} de 0,09. El cultivo se inició a un pH de 7,0.

El cultivo se llevó a cabo en un frasco de vidrio resistente a la presión de 500 ml a 37 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 170 h hasta una DO_{600nm} de 0,07 y un pH de 6,8.

Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).

Durante el cultivo principal, la concentración de acetato aumentó de 0,01 g/l a 0,45 g/l, para propionato de 0,00 g/l a 0,3 g/l y para propanol de 0,00 g/l a 0,16 g/l. La concentración de etanol disminuyó de 4,85 g/l a 3,95 g/l.

Ejemplo 5

Producción de propionato con Clostridium propionicum

Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico, la bacteria *Clostridium propionicum* se cultivó en medio con etanol y una atmósfera de gas con dióxido de carbono. Todas las etapas de cultivo se llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo.

Para el primer precultivo se inocularon 5 ml de una criosolución madre congelada a 50 ml de medio DSMZ156 (3,0 g/l de L-alanina, 3,0 g/l de peptona, 4,0 g/l de extracto de levadura, 0,1 g/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 18,0 mg/l de FeSO₄ x 7 H₂O, 5,0 mmol/l de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,1, 2,5 ml/l de solución saturada de sulfato de calcio, 1,0 mg/l de resazurina, 1 g/l de NaHCO₃) con 400 mg/l adicionales de clorhidrato de L-cisteína. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 250 ml a 37 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 21 h hasta una DO_{600nm} de 0,64.

Para el segundo precultivo, se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 100 ml de medio DSMZ156 con 400 mg/l de clorhidrato de L-cisteína adicional a una DO_{600nm} de 0,07. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 250 ml a 37 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 47 h hasta una DO_{600nm} de 0,69.

Para el cultivo principal se inocularon células centrifugadas procedentes del segundo precultivo a 100 ml de medio

ATCC1754 (pH = 6,0; 20 g/l de MES, 1 g/l de extracto de levadura, 0,8 g/l de NaCl, 1 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l de KCl, 0,1 g/l de KH₂PO₄, 0,2 g/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,02 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 20 mg/l de ácido nitrilotriacético, 10 mg/l de MnSO₄ x H₂O, 8 mg/l de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 mg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 0,2 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,2 mg/l de Na₂SeO₄, 0,2 mg/l de Na₂WO₄ x 2 H₂O, 20 µg/l de d-biotina, 20 µg/l de ácido fólico, 100 µg/l de piridoxina-HCl, 50 µg/l de tiamina-HCl x H₂O, 50 µg/l de riboflavina, 50 µg/l de ácido nicotínico, 50 µg/l de pantotenato de calcio, 1 µg/l de vitamina B₁₂, 50 µg/l de p-aminobenzoato, 50 µg/l de ácido lipoico, aproximadamente 67,5 mg/l de NaOH), con 400 mg/l de clorhidrato de L-cisteína, 5 ml/l de etanol y 2,35 g/l de KOH adicionales, a una DO_{600nm} de 0,166. El cultivo se inició a un pH de 6,6.

El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 500 ml a 37 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 165 h hasta una DO_{600nm} de 0,21 y pH 6,0.

Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).

Durante el cultivo principal, la concentración de acetato aumentó de 0,01 g/l a 1,15 g/l, para propionato de 0,02 g/l a 1,05 g/l, para propanol de 0,00 a 0,39 g/l y para butirato de 0 a 110 mg/l. La concentración de etanol disminuyó de 4,40 g/l a 2,75 g/l y para alanina de 34 mg/l a 0 mg/l durante este tiempo.

Ejemplo 6

Producción de propionato con Pelobacter propionicus

Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico, se cultivó la bacteria *Pelobacter propionicus* en medio con etanol y una atmósfera de gas con dióxido de carbono. Todas las etapas de cultivo se llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo.

Para el primer precultivo se inocularon 5 ml de una criosolución madre congelada a 50 ml de medio DSMZ295 (0,2 g/l de KH₂PO₄, 0,25 g/l de NH₄Cl, 1 g/l de NaCl, 0,4 g/l de MgCl₂ x 6 H₂O, 0,5 g/l de KCl, 0,15 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 2,8 mg/l de HCl, 1,5 mg/l de FeCl₂ x 4 H₂O, 0,07 mg/l de ZnCl₂ x 7 H₂O, 0,1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,006 mg/l de H₃BO₃, 0,19 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 0,002 mg/l de CuCl₂ x 6 H₂O, 0,024 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,036 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1 mg/l de resazurina, 2,5 g/l de NaHCO₃, 0,9 g/l de 2,3-butanodiol) con 360 mg/l adicionales de Na₂S. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 250 ml, a 30 °C, 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ durante 69 h hasta una DO_{600nm} de 0,19 y un pH de 6,2.

Para el segundo precultivo se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 2 x 100 ml de medio DSMZ295 con 360 mg/l de Na₂S y 420 mg/l de KOH adicionales hasta una DO_{600nm} de 0,055 y 0,053, respectivamente. El cultivo se realizó en 2 frascos de vidrio resistentes a la presión de 250 ml a 30 °C, 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ durante 72 h hasta una DO_{600nm} de 0,24 y un pH de 6,6 y DO_{600nm} de 0,23 y un pH de 6,4, respectivamente.

Para el cultivo principal se inocularon células centrifugadas procedentes de ambos segundos precultivos a 100 ml de medio DSMZ318 modificado (pH 7,4; 0,61 g/l de NaCl, 0,047 g/l de MgCl₂, 0,30 g/l de KH₂PO₄, 1,00 g/l de NH₄Cl, 0,081 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de peptona tripticasa BBL, 4 g/l de KHCO₃, 5 g/l de etanol, 0,5 mg/l de resazurina, 128 mg/l de ácido nitrilotriacético, 135 mg/l de FeCl₃ x 6 H₂O, 1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,24 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 1 mg/l de ZnCl₂, 0,25 mg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 0,1 mg/l de H₃BO₃, 0,24 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,26 mg/l de Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,02 mg/l de biotina, 0,02 mg/l de ácido fólico, 0,1 mg/l de piridoxina-HCl, 0,05 mg/l de tiamina-HCl x H₂O, 0,05 mg/l de riboflavina, 0,05 mg/l de ácido nicotínico, 0,05 mg/l de D-pantotenato de Ca, 1 µg/l de vitamina B₁₂, 0,05 mg/l de p-aminobenzoato, 0,05 mg/l de ácido lipoico) con 0,4 g/l de clorhidrato de L-cisteína, 0,7 g/l de KOH y 11,2 mg/l de HCl adicionales, a una DO_{600nm} de 0,10. El cultivo se inició a un pH de 6,8. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 500 ml a 30 °C, 100 rpm y una sobrepresión de 0,8 bares de un gas premezclado con el 67% de N₂ y el 33% de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 162 h hasta una DO_{600nm} de 0,13 y un pH de 6,5.

Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).

Durante el cultivo principal, la concentración de acetato aumentó de 0,02 g/l a 0,45 g/l, para el propionato de 0,02 a 0,27 g/l y para el propanol de 0,00 a 0,18 g/l. La concentración de etanol disminuyó de 4,6 g/l a 4,00 g/l.

Ejemplo 7

Producción de ácido propiónico y propanol con Clostridium neopropionicum sobre acetato

5 Para la biotransformación de etanol y dióxido de carbono en ácido propiónico y propanol, se cultivó la bacteria *Clostridium neopropionicum* en medio mineral con etanol, acetato y una atmósfera de gas con dióxido de carbono. Todas las etapas de cultivo se realizaron en condiciones anaeróbicas en frascos de vidrio resistentes a la presión que se pueden cerrar de forma estanca al aire con un tapón de goma de butilo. Para el primer precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon 5 ml de un criocultivo congelado a 500 ml de medio DSMZ318 (pH 7,4; 0,61 g/l de NaCl, 0,047 g/l de MgCl₂, 0,30 g/l de KH₂PO₄, 1,00 g/l de NH₄Cl, 0,081 g/l de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,5 g/l de extracto de levadura, 10 0,5 g/l de peptona tripticasa BBL, 4 g/l de KHCO₃, 10 g/l de etanol, 0,5 mg/l de resazurina, 128 mg/l de ácido nitrilotriacético, 135 mg/l de FeCl₃ x 6 H₂O, 1 mg/l de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,24 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 1 mg/l de ZnCl₂, 0,25 mg/l CuCl₂ x 2 H₂O, 0,1 mg/l de H₃BO₃, 0,24 mg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1,2 mg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 0,26 mg/l de Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,02 mg/l de biotina, 0,02 mg/l de ácido fólico, 0,1 mg/l de piridoxina-HCl, 0,05 mg/l de tiamina-HCl x H₂O, 0,05 mg/l de riboflavina, 0,05 mg/l de ácido nicotínico, 0,05 mg/l de D-pantotenato de Ca, 1 µg/l de vitamina B₁₂, 0,05 mg/l de p-aminobenzoato, 0,05 mg/l de ácido lipoico, 0,25 µg/l de cisteína-HCl x H₂O) en un frasco de 1 l y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. El cultivo se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 67 h hasta una DO_{600nm} de 0,17.

20 Para el segundo precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon células centrifugadas procedentes del primer precultivo a 500 ml de medio DSMZ318 nuevo en un frasco de 1 litro a una DO_{600nm} de 0,05 y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. Este cultivo en crecimiento se incubó a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 24 h hasta una DO_{600nm} de 0,13.

25 Para el tercer precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon células centrifugadas procedentes del segundo precultivo a 2 x 500 ml de medio DSMZ318 nuevo en frascos de 1 litro a una DO_{600nm} de 0,05 y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. Estos cultivos en crecimiento se incubaron a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 18 h hasta una DO_{600nm} de 0,26 y 0,25, respectivamente.

30 Para el cuarto precultivo de *C. neopropionicum* se inocularon células centrifugadas procedentes del tercer precultivo a 10 x 500 ml de medio DSMZ318 nuevo en frascos de 1 litro a una DO_{600nm} de 0,03 – 0,04 y se purgó con un gas premezclado con el 67% de H₂ y el 33% de CO₂ a una sobrepresión de 0,8 bares. Estos cultivos en crecimiento se incubaron a 30 °C y 100 rpm en un agitador de baño de agua abierto durante 22 h hasta una DO_{600nm} > 0,23

35 Para el cultivo principal, se añadieron tantas células centrifugadas del cuarto precultivo de *C. neopropionicum* que fueran necesarias para una DO_{600nm} de 0,75 a 50 ml de medio mineral LM33 nuevo (pH = 6,8; 10 g/l de etanol, 1 g/l de NaOH, 0,5 g/l de MgCl₂, 0,21 g/l de NaCl, 0,135 g/l de CaCl₂ X 2 H₂O, 2,65 g/l de NaH₂PO₄ x 2 H₂O, 0,5 g/l de KCl, 2,5 g/l de NH₄Cl, 15 mg/l de ácido nitrilotriacético, 30 mg/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 5 mg/l de MnSO₄ x H₂O, 1 mg/l de FeSO₄ x 7 H₂O, 8 mg/l de Fe(SO₄)₂(NH₄)₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 200 µg/l de CuCl₂ x 2 H₂O, 200 µg/l de KAl(SO₄)₂ x 12 H₂O, 3 mg/l de H₃BO₃, 300 µg/l de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 200 µg/l de Na₂SeO₃, 200 µg/l de NiCl₂ x 6 H₂O, 200 µg/l de Na₂WO₄ x 6 H₂O, 200 µg/l de d-biotina, 200 µg/l de ácido fólico, 100 µg/l de piridoxina-HCl, 500 µg/l de tiamina-HCl, 500 µg/l de riboflavina, 500 µg/l de ácido nicotínico, 500 µg/l de pantotenato de calcio, 500 µg/l de vitamina B₁₂, 500 µg/l de p-aminobenzoato, 500 µg/l de ácido lipoico, 10 mg/l de FeCl₃, aireado durante 30 minutos con CO₂) con 13,9 g/l de acetato de sodio adicional. El cultivo se realizó en un frasco de vidrio resistente a la presión de 250 ml a 30 °C, 150 rpm y una sobrepresión de 0,3 bares de CO₂ en un agitador de baño de agua abierto durante 5 h. El pH disminuyó durante este tiempo de 7,0 a 6,8. La DO_{600nm} disminuyó de 0,75 a 0,71.

50 Durante el cultivo se tomaron varias muestras de 5 ml para determinar la DO_{600nm}, el pH y la formación de producto. La determinación de las concentraciones del producto se realizó mediante espectroscopía de RMN de ¹H semicuantitativa. Como patrón de cuantificación interno se utilizó trimetilsililpropionato de sodio (T(M)SP).

55 Durante el cultivo, la concentración de propionato aumentó de 0,03 g/l a 0,77 g/l, para propanol de 0,01 a 0,02 g/l y para lactato de 0,00 g/l a 0,08 g/l. No se formó butirato. La concentración de etanol disminuyó de 9,25 g/l a 8,04 g/l durante este tiempo. La selectividad de la formación de propionato/propanol fue de aproximadamente el 92,1%.

Referencias

60 Drake et al., 2004. Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects. p. 251-281, Horizon Scientific Press, Reino Unido.

Drake & Kusel, 2005 Acetogenic clostridia. En: Dürre, P. (ed.), Handbook on Clostridia, p. 719-746. CRC Press, Boca Raton, Florida

65 Drake et al., 2006, Acetogenic prokaryotes. En: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W y Gerhardt, P et al. (ed) American Society for Microbiology, Washington, DC., p. 248-277

Fuchs G., Schlegel H.-G. (2007) Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Galaction, A.-I. et al., (2012) Chemical Engineering & Technology, 35(9), 1657-1663

5 Kandasamy V., 2013, Appl Microbial Biotechnol: 97:1191-1200)

Keshav, Amit et al., Desalination (2009), 244(1-3), 12-23

Sakai et al., 2004 Biotechnol. Let., Vol. 29, p. 1607-1612

10 Wood, 1991 Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. FASEB J. 5:156-163 Zhang Y, 2013, Bioprocess Biosyst Eng; 36(12):1897-1904

15 Documento U.S. 2007/0275447, documento U.S. 2008/0057554, documento WO 98/00558, documento WO 00/68407

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir propanol y/o ácido propiónico, procedimiento que comprende:

5 (b) poner en contacto al menos un propionógeno con dióxido de carbono y con un medio acuoso que comprende etanol y acetato;

en el que el acetato se mantiene a una concentración de al menos 1 g/l en el medio acuoso durante el periodo de reacción.

10

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el etanol y el acetato se producen exógenamente.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el propionógeno se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium neopropionicum*, *Clostridium propionicum*, *Pelobacter propionicus*, *Desulfobulbus propionicus*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophobacter pfennigii*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Smithella propionica*, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subespecie *thermosyntrophicum*, *Pelotomaculum thermopropionicum* y *Pelotomaculum schinkii*.

15

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el propionógeno es *Clostridium neopropionicum*.

20

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de acetato se mantiene entre 1 g/l y 10 g/l en el medio acuoso.

25

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de acetato se mantiene entre 1,5 g/l y 7 g/l en el medio acuoso.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de acetato se mantiene a aproximadamente 2 g/l en el medio acuoso, en el que "aproximadamente" se refiere a una variación dentro del 20 por ciento.

30

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, procedimiento que comprende una etapa (a) para producir etanol y acetato, en el que la etapa (a) comprende:

35 (a) poner en contacto al menos una bacteria acetogénica con una fuente de carbono, en el que la fuente de carbono comprende dióxido de carbono y/o monóxido de carbono.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la bacteria acetogénica se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autothenogenum* DSMZ 19630, *Clostridium ragsdahlei* ATCC N° BAA-622, *Clostridium autoethanogenum*, *Moorella sp* HUC22-1, *Moorella thermoaceticum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Rumicoccus productus*, *Acetoanaerobium*, *Oxobacter pfennigii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Carboxydotherrmus*, *Desulfotomaculum kutznetsovii*, *Pyrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Butyribacterium methylotrophicum* ATCC 33266, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus delbrukii*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Propionispora arboris*, *Anaerobierspirillum succiniproducens*, *Bacterioides amylophilus*, *Bacterioides ruminicola*, *Thermoanaerobacter kivui*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium notera*, *Clostridium aceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Moorella thermoacetica*, *Eubacterium limosum*, *Peptostreptococcus productus*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium* ATCC 29797 y *Clostridium carboxidivorans*.

40

45

10. Procedimiento según la reivindicación 8 o 9, en el que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en un único fermentador.

50

11. Uso de acetato para aumentar la proporción de etanol convertido en propanol y/o ácido propiónico por un propionógeno en un medio acuoso, en el que el acetato en el medio acuoso se mantiene a una concentración de al menos 1 g/l durante el periodo de reacción, en el que el propionógeno se pone en contacto con dióxido de carbono y con el medio acuoso que comprende el etanol y el acetato.

55

12. Uso según la reivindicación 11, en el que el etanol y el acetato son etanol y acetato producidos exógenamente.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el propionógeno se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium neopropionicum*, *Clostridium propionicum*, *Pelobacter propionicus*, *Desulfobulbus propionicus*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophobacter pfennigii*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Smithella propionica*, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subespecie *thermosyntrophicum*, *Pelotomaculum thermopropionicum* y *Pelotomaculum schinkii*.

60

14. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la concentración de acetato se mantiene entre 1,5 g/l y 7 g/l en el medio acuoso.

65

15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la concentración de acetato se mantiene a aproximadamente 2 g/l en el medio acuoso, en el que "aproximadamente" se refiere a una variación dentro del 20 por ciento.