

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 491**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/26 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014** **PCT/US2014/025128**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14151158**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 14768693 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** **EP 2970868**

54 Título: **Método para controlar la producción de metabolitos en una fermentación microbiana**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791065 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2025

73 Titular/es:

LANZATECH NZ, INC. (100.00%)
Corporation Trust Center1, 209 Orange Street
Wilmington, New Castle Delaware 19801, US

72 Inventor/es:

SIMPSON, SEAN, DENNIS;
KOEPKE, MICHAEL;
SMART, KATHLEEN, FRANCES;
TRAN, LOAN, PHUONG y
SECHRIST, PAUL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 998 491 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para controlar la producción de metabolitos en una fermentación microbiana

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere en general a métodos para controlar la producción de uno o más productos, por fermentación microbiana. En particular, la invención se refiere a métodos para controlar la cantidad de dióxido de carbono proporcionada a un cultivo microbiano. En realizaciones particulares, un perfil metabólico de un proceso de fermentación se controla controlando la cantidad de CO₂ disuelto proporcionado a un cultivo como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

El etanol se está convirtiendo rápidamente en un importante combustible de transporte líquido rico en hidrógeno en todo el mundo. El consumo mundial de etanol en 2002 fue de aproximadamente 40,88 mil millones de litros (10,8 mil millones de galones). También se espera que la industria del combustible etanol crezca considerablemente en el futuro, debido a un mayor interés en el etanol en Europa, Japón, los EE.UU. y diversas naciones en desarrollo.

Por ejemplo, en los EE.UU., el etanol se usa para producir E10, una mezcla al 10 % de etanol en gasolina. En las mezclas E10, el componente de etanol actúa como 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 para el transporte, tanto como agente oxigenante combinado en gasolina, o como combustible puro por derecho propio. También, en Europa, las preocupaciones ambientales en torno a las consecuencias de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) han sido el estímulo para que la Unión Europea (UE) establezca para sus países miembros un objetivo obligatorio para el consumo de combustibles de transporte sostenibles tales como el etanol derivado de biomasa.

La gran mayoría del etanol combustible se produce a través de procesos de fermentación tradicionales basados en levaduras que usan carbohidratos derivados de cosechas, tales como sacarosa extraída de la caña de azúcar o almidón extraído de cultivos de cereales, como la principal fuente de carbono. Sin embargo, el coste de estas reservas de alimentos con carbohidratos está influenciado por su valor como alimento humano o alimento para animales, mientras que el cultivo de almidón o cultivos productores de sacarosa para la producción de etanol no es económicamente sostenible en todas las geografías. Por lo tanto, es de interés el desarrollo de tecnologías para convertir recursos de carbono de menor coste y/o más abundantes en etanol combustible.

El monóxido de carbono (CO) es un subproducto importante libre y muy energético de la combustión incompleta de materiales orgánicos tales como el carbón o el petróleo y productos derivados del petróleo. Por ejemplo, se informa que la industria del acero en Australia produce y libera a la atmósfera más de 500.000 toneladas de CO anualmente.

Desde hace mucho tiempo se reconoce que pueden usarse procesos catalíticos para convertir gases compuestos principalmente de CO y/o CO e hidrógeno (H₂) en una diversidad de combustibles y productos químicos. Sin embargo, los microorganismos también pueden usarse para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procesos biológicos, aunque generalmente 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 su única fuente de carbono se descubrió por primera vez en 1903. Esto se determinó más tarde que era una propiedad de los organismos que usan la ruta bioquímica de la acetil coenzima A (acetil CoA) de crecimiento autótrofo (también conocida como la ruta de Woods-Ljungdahl y la de monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil CoA sintasa (CODH/ACS)). Un gran número de organismos anaerobios incluyendo organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanógenos y acetógenos metabolizan el CO a diversos productos finales, en concreto CO₂, H₂, metano, n-butanol, acetato y etanol. Aunque usan 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 de la acetil CoA. Por ejemplo, se describen diversas cepas de *Clostridium ljungdahlii* que producen etanol a partir de gases en el documento WO 00/68407, el documento EP 117309, las patentes de EE.UU. N.º 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, el documento WO 98/00558 y el documento WO 02/08438. La bacteria *Clostridium autoethanogenum* sp también se sabe que produce etanol a partir de gases (Abrini et al, Archives of Microbiology 161, pág. 345-351 (1994)).

Sin embargo, la producción de etanol por microorganismos por fermentación de gases se asocia siempre con la coproducción de acetato y/o ácido acético. Como parte del carbono disponible se convierte en acetato/ácido acético en lugar de etanol, la eficiencia de producción de etanol usando tales procesos de fermentación puede ser menor que la deseable. También, a menos que el subproducto acetato/ácido acético pueda usarse para algún otro fin, este puede

plantear un problema de eliminación de residuos. El acetato/ácido acético se convierte en metano por microorganismos y, por lo tanto, tiene el potencial de contribuir a las emisiones de gases de efecto invernadero.

La importancia de controlar los parámetros del medio nutritivo líquido usado para cultivar bacterias o microorganismos dentro de un biorreactor usado para la fermentación se ha reconocido en la técnica. el documento NZ 556615, presentado el 18 de julio de 2007 describe, en particular, la manipulación del pH y del potencial redox de dicho medio nutritivo líquido. Por ejemplo, en el cultivo de bacterias acetogénicas anaerobias, elevando el pH del cultivo a más de aproximadamente 5,7 mientras se mantiene el potencial redox del cultivo a un nivel bajo (-400 mV o menos), las bacterias convierten el acetato producido como subproducto de la fermentación en etanol a un ritmo mucho mayor que en condiciones de pH más bajos. El documento NZ 556615 reconoce además que pueden usarse diferentes niveles de pH y potenciales redox para optimizar las condiciones dependiendo del papel principal que desempeñan las bacterias (es decir, crecimiento, producción de etanol a partir de acetato y un sustrato que contiene CO gaseoso, o producción de etanol a partir de un sustrato que contiene CO gaseoso).

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

El pH del medio nutritivo líquido puede ajustarse añadiendo uno o más agentes de ajuste de pH o tampones al medio. Por ejemplo, pueden usarse bases tales como NaOH y ácidos tales como ácido sulfúrico para aumentar o disminuir el pH según se requiera. El potencial redox puede ajustarse añadiendo uno o más agentes reductores (por ejemplo, metilviolígeno) o agentes oxidantes. Como alternativa el pH del medio puede ajustarse proporcionando una cantidad excesiva de sustrato gaseoso a la fermentación de tal manera que los microorganismos reciban un "sobrealimentación" de gas.

Pueden usarse procesos similares para producir otros alcoholes, tales como butanol, como sería evidente para un experto en la materia.

Los métodos para aumentar la producción de alcoholes, usando microorganismos acetogénicos carboxidotróficos, variando la concentración de gases durante la fermentación se han desvelado en, por ejemplo:

En el documento WO 2010/064933, la eficiencia de la fermentación de un sustrato que comprende CO se mejora añadiendo un polisulfuro, mejorando de esta manera la producción de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) de tal manera que la relación de producto etanol:2,3-BDO es menos de 2: 1.

En el documento US 2012/252082 se producen 2,3-BDO y al menos etanol como coproducto usando un sustrato que comprende al menos CO y H₂. La productividad de 2,3-BDO puede controlarse alterando la absorción de H₂ en el biorreactor, limitando la concentración de H₂ del sustrato a menos del 20 % aumenta la producción de 2,3-BDO.

En el documento WO 2009/151342, la tasa de producción de 2,3-BDO en la fermentación de un sustrato que comprende al menos CO aumenta cuando se mantiene una tasa específica de absorción de CO de al menos 0,4 mmol de CO/gramo de peso de células secas de bacterias/minuto por el cultivo durante la fermentación.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso que sirva al menos de alguna manera para superar las desventajas anteriores, o al menos proporcionar al público una opción útil.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la invención se proporciona un método para controlar el perfil metabólico de un cultivo de fermentación que comprende al menos un microorganismo acetogénico carboxidotrófico, comprendiendo el método:

- hacer fluir un sustrato gaseoso que comprende CO y CO₂ a un biorreactor que comprende un cultivo del microorganismo en un medio nutritivo líquido; y
- ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en el cultivo de tal manera que se altere el metabolismo del cultivo.

En una realización la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido se ajusta controlando el flujo de CO₂ al biorreactor. En una realización, aumentar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido altera el metabolismo del microorganismo de tal manera que aumenta la producción de uno o más productos derivados del piruvato. En una realización, disminuir la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido altera el metabolismo del microorganismo de tal manera que disminuye la producción de uno o más productos derivados del piruvato.

En una realización el uno o más productos derivados del piruvato se seleccionan del grupo que consiste en 2,3-butanodiol (2,3-BDO), lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, isopropanol, acetoina, iso-butanol, citramalato, butadieno y ácido poliláctico (PLA).

En una realización, la fermentación se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 250 a aproximadamente

450 kPag (o mayor de 500 kPag), de tal manera que se aumenta la concentración de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido. En determinadas realizaciones, la presión es mayor que 250 kPag o mayor que 300 kPag, o mayor que 350 kPag, o mayor que 400 kPag, o mayor que 450 kPag, o mayor que 500 kPag.

5 En una realización alternativa, la presión en el reactor se reduce o se minimiza para promover la producción de uno o más productos derivados del acetil CoA en comparación con uno o más productos derivados del piruvato. En determinadas realizaciones, la presión en el biorreactor es de aproximadamente la atmosférica a aproximadamente 200 kPag o se mantiene por debajo de 200 kPag, o menos de 150 kPag, o menos de 100 kPag, o menos de 50 kPag, o a presión atmosférica.

10 En una realización se aumenta la presión parcial de CO₂, para aumentar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido.

15 En una realización, la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido aumenta al aumentar la cantidad de CO₂ en el sustrato gaseoso proporcionado a la fermentación. En una realización la concentración de CO₂ en el sustrato proporcionado al biorreactor es al menos el 10 %, o al menos el 15 %, o al menos el 18 %, o al menos el 20 %, o al menos el 25 %, o al menos el 30 %, o al menos el 35 %, o al menos el 40 %, o al menos el 45 %. En determinadas realizaciones, la concentración de CO₂ en el sustrato proporcionado al biorreactor está entre el 15 % y el 65 %, o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %, o de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 45 %.

20 En realizaciones donde se aplica presión a la fermentación, la cantidad de CO₂ necesaria para la fermentación se reduce. En presencia de una presión mayor de aproximadamente 50 kPag, la cantidad de CO₂ proporcionada en la corriente de sustrato es sustancialmente menor que cuando se proporciona a presión atmosférica. En realizaciones particulares, la concentración de CO₂ en el sustrato proporcionado al biorreactor es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 50 % cuando se suministra a una presión superior a aproximadamente 50 kPag.

25 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para aumentar la producción de al menos un producto derivado del piruvato, comprendiendo el método:

30 a. hacer fluir un sustrato que comprende CO y CO₂ a un biorreactor que comprende un cultivo de al menos un microorganismo acetogénico carboxidotrófico en un medio nutritivo líquido; y
b. ajustar la cantidad de CO₂ que fluye al biorreactor de manera tal que se aumente la cantidad de CO₂ disuelto proporcionado en el medio nutritivo líquido.

35 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para controlar una relación de productos derivados de piruvato con respecto a productos derivados de acetil co-A, comprendiendo el método;

40 a. hacer fluir un sustrato que comprende CO y CO₂ a un biorreactor que comprende un cultivo de al menos un microorganismo acetogénico carboxidotrófico en un medio nutritivo líquido; y
b. ajustar el flujo de dióxido de carbono al biorreactor de tal manera que la cantidad de CO₂ disuelta en el medio nutritivo líquido controle de esta manera la relación entre los productos derivados del piruvato y los productos derivados del acetil CoA.

45 En una realización de la invención, aumentar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido aumenta la relación entre productos derivados del piruvato y productos derivados del acetil CoA al aumentar la producción de productos derivados del piruvato. En una realización, disminuir la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido disminuye la relación entre productos derivados del piruvato y productos derivados del acetil CoA al disminuir la producción de productos derivados del piruvato.

50 En un cuarto aspecto se proporciona un método para controlar el perfil metabólico de un cultivo de fermentación que comprende al menos un microorganismo acetogénico carboxidotrófico, comprendiendo el método

55 a. hacer fluir un sustrato gaseoso que comprende CO y CO₂ a un biorreactor que comprende un cultivo del microorganismo en un medio nutritivo líquido;
b. monitorizar la concentración de CO₂ en una corriente de salida que sale del biorreactor; y
c. ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido de tal manera que se controle el metabolismo del cultivo.

60 En un quinto aspecto se proporciona un método para aumentar la producción de uno o más productos, comprendiendo el método;

a. proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos en un medio nutritivo líquido; y
b. fermentar el sustrato para producir uno o más productos líquidos y CO₂.

65 En una realización se ajustan una o más condiciones de fermentación para aumentar la cantidad de CO consumido por el cultivo y la cantidad de CO₂ producido por el cultivo. En una realización la cantidad de CO consumida por el

cultivo aumenta alterando la transferencia de masa en la fermentación. En una realización, la cantidad de CO consumida por el cultivo aumenta al aumentar la velocidad de flujo del sustrato gaseoso al biorreactor. En una realización la cantidad de CO consumida por el cultivo aumenta aumentando la velocidad de agitación del medio nutritivo líquido en el biorreactor. En una realización la cantidad de CO consumido por el cultivo aumenta aumentando el área de superficie de la burbuja.

En una realización, aumentar la cantidad de CO consumido por el cultivo microbiano aumenta la cantidad de CO₂ en una corriente de salida que sale del biorreactor. En una realización, la cantidad de CO₂ en la corriente de salida es al menos el 30 %, o al menos el 35 %, o al menos el 40 %, o al menos el 45 %, o al menos el 50 %.

En un sexto aspecto, se proporciona un método para aumentar la cantidad de CO₂ disuelto en un medio nutritivo líquido que comprende un cultivo de al menos un microorganismo, comprendiendo el método;

- a. introducir una corriente de gas de suministro que comprende CO y un medio nutritivo líquido a al menos un biorreactor para formar un caldo de fermentación, comprendiendo además el biorreactor una bajante para hacer circular una porción del caldo de fermentación desde un punto cerca de la parte superior del biorreactor hasta un punto cerca de la parte inferior del biorreactor;
- b. fermentar el CO en el biorreactor para obtener productos líquidos y una corriente de salida de gas que comprende CO₂;
- c. pasar al menos una parte de la corriente de salida de gas a la bajante del biorreactor que es la fuente de la corriente de salida de gas ubicada cerca de la parte superior del biorreactor o a un segundo biorreactor; y
- d. mezclar la corriente de salida de gas y el medio nutritivo líquido a lo largo de la bajante para formar una mezcla de gas y líquido, aumentando de esta manera la presión hidrostática por encima de la mezcla de gas y líquido, de tal manera que el CO₂ de la corriente de gas de salida se disuelve en el medio nutritivo líquido en la parte inferior de la bajante.

En una implementación específica la corriente de gas de salida del primer biorreactor pasa a la bajante de un segundo biorreactor. En una realización la corriente de gas de salida del primer biorreactor se recicla a la bajante del primer biorreactor. Como alternativa, la corriente de gas de salida del primer biorreactor pasa a la entrada de gas del primer o el segundo biorreactor. Adicionalmente, la corriente de suministro al segundo reactor puede ser una porción de la corriente de gas de salida o de cola del primer reactor mezclada opcionalmente con una corriente de gas de suministro nueva. Pueden añadirse biorreactores adicionales en serie y hacer pasar corrientes de gas de salida al mismo biorreactor o a diferentes biorreactores como se describió anteriormente.

En un aspecto adicional se proporciona un método para producir uno o más productos mediante fermentación microbiana de un sustrato gaseoso, comprendiendo el método:

- a. En un primer reactor que comprende un cultivo de uno o más microorganismos carboxidotróficos en un medio nutritivo líquido, recibir un sustrato gaseoso que comprende CO;
- b. fermentar el sustrato gaseoso que comprende CO para producir uno o más productos líquidos y un gas de salida que comprende CO₂;
- c. suministrar el gas de salida que comprende CO₂ a un segundo biorreactor, dicho segundo biorreactor comprende un cultivo de uno o más microorganismos carboxidotróficos en un medio nutritivo líquido; y
- d. fermentar el gas de salida que comprende CO₂ para producir uno o más productos.

En una implementación, el gas de salida que comprende CO₂ se mezcla con uno o más sustratos gaseosos antes de suministrarse al segundo biorreactor. En un aspecto, se añade un sustrato gaseoso adicional al segundo biorreactor para su uso como sustrato en la fermentación microbiana.

En una configuración el uno o más microorganismos proporcionados en el primer biorreactor y el segundo biorreactor son el mismo. La fermentación microbiana produce al menos dos productos. En una configuración la relación de producción de los dos productos es diferente entre el primer biorreactor y el segundo biorreactor. En una realización, la fermentación produce al menos un alcohol y al menos un subproducto. En una realización la relación entre el al menos un producto y el al menos un subproducto es diferente en el primer y el segundo biorreactores. En una realización el producto es etanol y el subproducto es 2,3-butanodiol (2,3-BDO). En una configuración la relación de etanol (EtOH) a 2,3-BDO es menor en el segundo biorreactor.

En una realización el uno o más microorganismos se seleccionan del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljundgahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans* y *Clostridium coskatii*.

En una configuración un gas de cola que sale del segundo biorreactor puede reciclarse al primer biorreactor para su uso como un sustrato.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para controlar el perfil metabólico de un cultivo de fermentación que comprende al menos un microorganismo acetogénico carboxidotrófico, comprendiendo el método;

- a. hacer fluir un sustrato gaseoso que comprende CO a un biorreactor que comprende un cultivo del microorganismo en un medio nutritivo líquido para proporcionar un caldo de fermentación; y
- b. aumentar la tasa de oxidación de CO a través de una monóxido de carbono deshidrogenasa dependiente de ferredoxina para aumentar el nivel de ferredoxina reducida en el caldo de fermentación;

en donde el aumento del nivel de ferredoxina reducida aumenta la tasa de fermentación del piruvato a partir de acetil coA.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la ruta metabólica de los microorganismos de la presente invención.
 La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de la presión sobre las concentraciones de metabolitos durante la fermentación.
 La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido en la producción de 2,3-butanodiol.
 La Figura 4 es un gráfico que muestra la utilización de CO del cultivo microbiano del ejemplo 2.
 La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de CO₂ en la corriente de entrada sobre la concentración de metabolitos para el ejemplo 3A.
 La Figura 6 es un gráfico que muestra la captación de CO, CO₂ y H₂ por el cultivo microbiano del ejemplo 3A.
 La Figura 7 es un gráfico que muestra la concentración de metabolitos a lo largo del tiempo para el ejemplo 3B.
 La Figura 8 es un gráfico que muestra la composición del gas para el ejemplo 3B.
 La Figura 9 es un gráfico que muestra la absorción de diversos componentes de la corriente de gas de entrada del ejemplo 3C por el cultivo microbiano.
 La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar gradualmente el CO₂ en la corriente de gas de entrada en la concentración de metabolitos, por ejemplo 3C.
 La Figura 11 es un gráfico que muestra las concentraciones de metabolitos donde la concentración de CO₂ en la corriente de entrada se cicla de acuerdo con el ejemplo 3D.
 La Figura 12 es un gráfico que muestra la captación de diversos componentes en la corriente de entrada del ejemplo 3D por el cultivo microbiano.
 La Figura 13 es un gráfico que muestra las concentraciones de metabolitos para el ejemplo 3E.
 La Figura 14 es un gráfico que muestra la captación de diversos componentes en la corriente de entrada del ejemplo 3E por el cultivo microbiano.
 La Figura 15 es un gráfico que muestra las concentraciones de metabolitos para el ejemplo 4.
 La Figura 16 es un gráfico del CO₂ disuelto calculado frente a la tasa de producción de 2,3 butanodiol.
 La Figura 17 es una representación de un sistema que podría usarse en la presente invención.
 La Figura 18 es un gráfico que muestra la captación de diversos componentes en la corriente de entrada del ejemplo 4 por el cultivo microbiano.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto métodos y sistemas para controlar los productos metabólicos producidos por un cultivo de uno o más microorganismos acetogénicos carboxidotróficos. En particular los inventores han encontrado un método para aumentar la producción de uno o más productos derivados del piruvato en un proceso de fermentación.

La siguiente es una descripción de la presente invención, incluyendo realizaciones preferidas de la misma, dada en términos generales. La invención se ejemplifica además en la divulgación dada bajo el título "Ejemplos" a continuación en el presente documento, que proporciona datos experimentales que respaldan la invención, ejemplos específicos de aspectos de la invención y medios para realizar la invención.

Definiciones

Como se usa en el presente documento "butanodiol" se refiere a todos los isómeros estructurales del diol incluyendo 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol y 2,3-butanodiol y estereoisómeros de los mismos. Debe interpretarse que la expresión "2,3-butanodiol" incluye todas las formas enantioméricas y diastereoméricas del compuesto, incluyendo las formas (R,R), (S,S) y meso, en formas racémicas, parcialmente estereoisoméricamente puras y/o sustancialmente estereoisoméricamente puras.

El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o disposiciones de torres o tuberías, que incluye el reactor de tanque agitado de flujo continuo (CSTR, por sus siglas en inglés), Reactor de células inmovilizadas (ICR, por sus siglas en inglés), Reactor de lecho percolador (TBR, por sus siglas en inglés), Columna de burbujas, Fermentador de elevación de gases, Mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuados para el contacto gas-líquido. Como se describe más adelante en el presente documento, en algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, cuando se hace referencia a la adición de un sustrato, por ejemplo, un sustrato que comprende monóxido de carbono, al biorreactor o a la reacción de fermentación, debe entenderse que incluye la adición a uno o a ambos de estos reactores cuando sea apropiado.

La expresión "sustrato que comprende monóxido de carbono" y expresiones similares incluyen cualquier sustrato en el cual una o más cepas de bacterias disponen de monóxido de carbono para su crecimiento y/o fermentación, por ejemplo.

5 Los "sustratos gaseosos que comprenden monóxido de carbono" incluyen cualquier gas que contenga un nivel de monóxido de carbono. El sustrato gaseoso contendrá normalmente una proporción importante de CO, preferentemente de al menos aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 95% de CO en volumen.

10 Un "sustrato que comprende CO₂" incluye cualquier corriente de sustrato que contenga un nivel de dióxido de carbono. Sin embargo, debe apreciarse que el sustrato gaseoso puede proporcionarse en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato gaseoso que contiene CO₂ puede proporcionarse disuelto en un líquido. Esencialmente, un líquido se satura con un gas que contiene dióxido de carbono y después ese líquido se añade al biorreactor. Esto puede conseguirse usando metodología convencional. A modo de ejemplo, un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volumen 101, Número 3 / octubre de 2002) podría usarse. A modo de ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO₂ y H₂ puede adsorberse sobre un soporte sólido.

20 Las expresiones "que aumenta la eficacia", "eficacia aumentada" y similares, cuando se usan en relación a un proceso de fermentación, incluyen, pero no se limitan a, aumentar uno o más de la tasa de crecimiento de microorganismos que catalizan la fermentación, la tasa de crecimiento y/o la producción del producto a concentraciones elevadas de butanodiol, el volumen del producto deseado producido por volumen de sustrato consumido, la velocidad de producción o el nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido en comparación con otros subproductos de la fermentación.

25 Los términos o expresiones "productividad" o "tasa de producción" son la productividad volumétrica de un producto. En sistemas continuos la productividad volumétrica se calcula como la relación entre la concentración en estado estacionario del producto y el tiempo de retención de líquido. En sistemas discontinuos la productividad volumétrica se calcula como la concentración y el tiempo necesario para producir dicha concentración en un sistema discontinuo. 30 La productividad volumétrica se expresa como g/l/día.

A menos que el contexto requiera otra cosa, las expresiones "fermentación", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, como se usan en el presente documento, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del proceso.

35 La expresión "productos derivados de piruvato" o expresiones similares como se usan en el presente documento pretenden abarcar productos de fermentación que tienen un precursor de piruvato. Estos productos incluyen, pero no se limitan a, 2,3-butanodiol, lactato, succinato, Metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, isopropanol, acetoina, iso-butanol, citramalato, butadieno y ácido poliláctico.

40 La expresión "productos derivados de acetil CoA", "productos derivados a partir de acetil CoA" o expresiones similares usadas en el presente documento pretenden abarcar productos de fermentación que tienen un precursor de acetil CoA. Estos productos incluyen pero no se limitan a etanol, ácido acético, acetona, butanol, 3-hidroxibutirato e isobutileno, 3-hidroxipropionato (3HP) y ácidos grasos.

45 Se ha descubierto que la producción de 2,3-butanodiol en los procesos de fermentación aumenta durante los períodos en que el cultivo microbiano muestra signos de estrés. Los inventores han identificado varios indicadores de estrés que se corresponden con un aumento en la cantidad de 2,3-butanodiol, incluyendo producción de lactato por el cultivo microbiano, aumento del pH del cultivo microbiano y una disminución de la concentración de biomasa del cultivo microbiano. Curiosamente, los inventores han demostrado que la producción de 2,3-butanodiol por cultivo microbiano no es un indicador de estrés y que es posible proporcionar un cultivo microbiano saludable y estable que tenga una productividad aumentada de 2,3-butanodiol.

50 Anteriormente se ha demostrado que la productividad aumentada de 2,3-butanodiol estaba influenciada por una tasa de consumo de hidrógeno por un cultivo microbiano (documento WO2012131627).

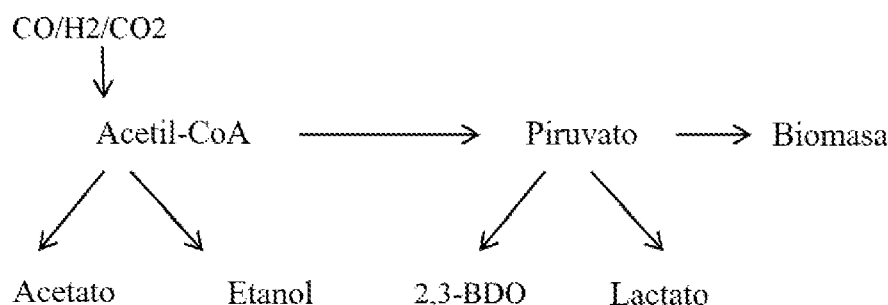
Efecto del CO₂ sobre la fermentación

60 Los inventores han descubierto que al alterar la cantidad de CO₂ proporcionada al cultivo microbiano, la ruta metabólica del microorganismo se ve afectada. Al alterar la cantidad de CO₂ proporcionada al cultivo microbiano, el metabolismo del cultivo puede manipularse.

65 Los inventores han demostrado sorprendentemente que la producción de productos derivados del piruvato aumenta cuando se proporciona al cultivo microbiano una cantidad aumentada de dióxido de carbono. En consecuencia se ha descubierto que la producción de productos derivados del acetil CoA aumenta y la producción de productos derivados del piruvato disminuye cuando disminuye la cantidad de CO₂ disuelto en el cultivo microbiano.

Se ha demostrado anteriormente que proporcionar un cultivo carboxidotrófico con un sustrato que comprende CO y opcionalmente hidrógeno, en condiciones de fermentación, da como resultado la producción de alcoholes y ácidos. También se ha demostrado anteriormente la producción de etanol, con la producción de subproductos adicionales incluyendo 2,3-butanodiol y ácido acético.

Los inventores han descubierto ahora que al suministrar adicionalmente dióxido de carbono al cultivo microbiano, puede controlarse el metabolismo del brazo piruvato de la ruta metabólica. La ruta metabólica descrita anteriormente se muestra con más detalle en la Figura 1 y a continuación.



Los acetógenos carboxidotróficos usan la ruta de Wood-Ljungdahl para fijar el carbono en acetil-CoA (Drake, Küsel, Matthies, Wood, & Ljungdahl, 2006; Wood, 1991), que sirve como precursor de productos tales como acetato y etanol y para la biosíntesis de ácidos grasos. Además del acetil-CoA, el otro intermedio clave en la célula es el Piruvato (ácido pirúvico) que sirve como precursor de productos como 2,3-butanodiol, ácido láctico o ácido succínico, así como aminoácidos, vitaminas o ácidos nucleicos necesarios para el crecimiento y la formación de biomasa. El acetil-CoA puede convertirse directamente en piruvato o viceversa en una sola etapa enzimática reversible catalizada por una piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), a veces también denominada piruvato sintasa (EC 1.2.7.1). La reacción de PFOR se ve como sigue en la reacción 1:

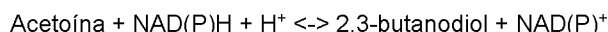
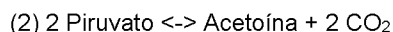


$$\Delta G^{\circ} = -4,6 \text{ kcal/mol (19,2 kJ/mol) (Thauer, Jungermann, Decker, & Pi, 1977)}$$

En los acetógenos carboxidotróficos que crecen de forma autótrofa todo el piruvato producido debe pasar primero por el acetil-CoA. Como el acetil-CoA es un compuesto C2 y el piruvato un compuesto C3, es necesario incorporar una molécula de CO₂ (reacción 1). La energía para esta reacción la proporciona la ferredoxina reducida ($E_0' = -398 \text{ mV}$).

Una estrategia para aumentar la tasa de formación de piruvato es aumentar el nivel de eductos o reactivos en esta reacción (equilibrio dinámico). Aumentar el nivel de CO₂ en el gas de suministro aumentará la tasa de formación de piruvato a partir de acetil-CoA, mientras que la reacción inversa disminuye hasta un punto donde la reacción es prácticamente irreversible en dirección a la formación de piruvato. De manera similar, el nivel de ferredoxina reducida puede aumentarse, por ejemplo, aumentando la tasa de oxidación de CO a través de la monóxido de carbono deshidrogenasa dependiente de ferredoxina.

El piruvato (ácido pirúvico) es un ácido con un pKa muy bajo de 2,5 y, por lo tanto, en concentraciones más altas representa una amenaza para las bacterias al destruir el gradiente de protones esencial a través de la membrana necesario para la formación de ATP (Köpke y Dürre, 2011). Un sumidero para las bacterias es producir 2,3-butanodiol que les permitirá neutralizar el ácido pirúvico y salvar la célula. Por lo tanto, aumentar el nivel de CO₂ en el gas de suministro aumentará la formación de 2,3-butanodiol indirectamente a través de mayores tasas de formación de piruvato. La reacción para la producción de 2,3-butanodiol a partir de piruvato es la siguiente en la reacción 2:



El ácido láctico y el ácido succínico son productos derivados del piruvato que representan otro sumidero y aunque son ácidos mucho más débiles (pKa 4,2 y 5,6 respectivamente), también suponen una amenaza para las bacterias a niveles más altos. Por otro lado, limitar su producción podría aumentar la reserva de piruvato y dar lugar a una producción aumentada de 2,3-butanodiol.

Los inventores han demostrado que aumentando la concentración de CO₂ en el reactor se puede aumentar la producción de piruvato en relación con acetil-CoA. Aumentar la concentración de CO en el reactor o la tasa de oxidación de CO por el CODH conduciría a un nivel aumentado de ferredoxina reducida, puede aumentarse la producción de piruvato en relación con el acetil-CoA.

En particular, los inventores han demostrado que la relación de productos derivados de acetil-CoA, por ejemplo, etanol, a productos derivados del piruvato, por ejemplo, 2,3-butanodiol, puede aumentarse incrementando la concentración de CO₂ disuelto en el medio líquido del reactor. La cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido puede aumentarse al aumentar la cantidad de CO₂ en el sustrato gaseoso proporcionado a la fermentación. En una realización la concentración de CO₂ en el sustrato proporcionado al biorreactor es al menos el 10 %, o al menos el 15 %, o al menos el 18 %, o al menos el 20 %, o al menos el 25 %, o al menos el 30 %, o al menos el 35 %, o al menos el 40 %, o al menos el 45 %. En determinadas realizaciones, la concentración de CO₂ en el sustrato proporcionado al biorreactor está entre el 15 % y el 65 %, o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %, o de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 45 %.

Mientras que las bajas concentraciones de CO₂ disuelto (por ejemplo, del 0 al 10 % de CO₂ en la corriente de gas de entrada) proporcionadas al cultivo producirán etanol a 2,3-butanodiol en una proporción de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 20:1, los inventores han demostrado que concentraciones mayores de CO₂ (por ejemplo, el 10-65 % de CO₂ en la corriente de gas de entrada) proporcionadas al cultivo producirán una relación de etanol a 2,3-butanodiol de aproximadamente 20:1 a 1:1, preferentemente de 10:1 a 1:1.

En los casos en que se desea una baja producción de productos derivados del piruvato, puede marcarse como diana una concentración baja de CO₂ disuelto. Este método también puede usarse para aumentar la producción de productos derivados del acetil-CoA. Por ejemplo, una corriente de entrada de gas con el 0-10 % de CO₂ en la corriente de gas de entrada dará como resultado una alta relación de etanol a 2,3-butanodiol.

Además, se ha descubierto que aumentar la cantidad de CO consumido por el cultivo aumenta la cantidad de CO₂ producido, lo que a su vez aumenta la producción de productos derivados del piruvato. La cantidad de CO consumido por el cultivo puede aumentarse alterando la transferencia de masa en la fermentación, aumentando la velocidad de flujo del sustrato gaseoso al biorreactor y/o aumentando la velocidad de agitación del medio nutritivo líquido en el biorreactor. La cantidad de CO consumida por el cultivo también puede aumentarse aumentando la superficie de la burbuja. Normalmente, puede lograrse una alta transferencia de masa introduciendo el sustrato gaseoso en forma de burbujas finas. Los expertos en la materia apreciarán los medios para introducir el sustrato gaseoso, tales como rociadores.

CO₂ disuelto y presión

Los inventores han identificado una serie de métodos para controlar y ajustar la cantidad de CO₂ disuelto proporcionado a un cultivo microbiano para controlar el perfil metabólico de la fermentación. Uno de estos métodos para ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido incluye ajustar la presión del sistema.

Los inventores han demostrado que aumentar la presión en el biorreactor conducirá a un aumento en la cantidad de CO₂ disuelto en el medio de fermentación. Para aumentar la producción de productos derivados del piruvato, la fermentación debe llevarse a cabo a una presión de aproximadamente 250 a aproximadamente 450 kPag (o mayor de 500 kPag), de tal manera que se aumenta la concentración de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido. En determinadas realizaciones, la presión es mayor que 250 kPag o mayor que 300 kPag, o mayor que 350 kPag o mayor que 400 kPag, o mayor que 450 kPag, o mayor que 500 kPag.

En los casos en que el CO₂ se proporciona al reactor a una presión de 50 kPag o mayor, se requiere una menor concentración de CO₂ en el sustrato para producir niveles más altos de productos derivados del piruvato. A medida que el cultivo produce CO₂ a través de la utilización de CO, puede suministrarse al reactor una corriente de gas de entrada con una concentración mínima de CO₂ si la presión es sustancialmente alta. En determinadas realizaciones la cantidad de CO₂ proporcionada al reactor a una presión de 50 kPag o superior, es menos del 10 %, o menos del 5 %, o menos del 1 %. En determinadas realizaciones no se proporciona sustancialmente CO₂ al reactor a una presión de 50 kPag o mayor. Preferentemente, la concentración de CO₂ de una corriente de gas de entrada suministrada a una presión de 50 kPag o mayor es de aproximadamente el 0 % al 50 %.

Los inventores han demostrado que la producción de 2,3-butanodiol está influenciada por la cantidad de presión parcial de CO₂ en el fermentador, que a su vez cambia la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido. Las presiones parciales de CO₂ más altas de la corriente de gas aumentarán la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido. En realizaciones preferidas, el CO₂ se suministrará al reactor a una presión parcial entre aproximadamente 50 kPag y aproximadamente 500 kPag.

Adicionalmente, los inventores han demostrado que también es posible aumentar gradualmente la cantidad de CO₂ disuelto aumentando gradualmente la cantidad de CO₂ suministrada al reactor.

La cantidad de CO₂ en algunas corrientes gaseosas puede no ser suficiente para permitir una cantidad suficiente de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido. Para superar este problema, los inventores han proporcionado un método para aumentar la cantidad de CO₂ reciclando un gas de cola o de salida desde la salida del biorreactor a la entrada del biorreactor. Para cambiar la cantidad de presión parcial de CO₂ y, por lo tanto, el CO₂ disuelto, independientemente

de la presión parcial de CO y de la presión total, el gas de salida/gas de cola puede reciclarse al mismo reactor. El proceso de fermentación dentro del reactor dará como resultado una alta conversión de CO y H₂ y, por lo tanto, el gas de cola estará compuesto principalmente por CO₂ y cualquier especie de gas inerte. Por lo tanto, el reciclaje del gas de cola permitiría controlar la presión parcial de CO₂ independientemente de la presión parcial de CO y de la presión total.

El uso de un sistema de dos reactores permite que un gas de salida que comprende CO₂ que sale de un primer biorreactor pase a un segundo biorreactor. Al suministrar el gas de salida que comprende CO₂ a la bajante del segundo biorreactor, en lugar de al recipiente del reactor, la presión parcial de CO₂ en el reactor aumenta. A medida que la mezcla de CO₂ y líquido desciende por la bajante, la carga hidrostática aumenta, aumentando de esta manera la cantidad de CO₂ disuelto en la solución.

Para reciclar el gas de cola de un primer reactor a un segundo reactor o reactor receptor, la presión del espacio de cabeza del primer reactor debe ser ligeramente superior a la presión en la bajante del reactor receptor, para superar la pérdida de línea y la caída de presión del burbujeador. Para reciclar el "gas de cola" de su propio espacio de cabeza, el gas de cola podría reciclarse hacia la entrada de gas o hacia la bajante, donde la bajante necesitaría un eductor para capturar el gas de cola (usando el flujo de líquido en la bajante para arrastrar el gas de cola). La cantidad de CO₂ que se recicla en la bajante se controlaría de tal manera que el CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido se optimizaría durante la rampa. La Figura 17 proporciona una representación de un reactor de bucle circulado con un sustrato rico en CO₂ proporcionado a la bajante, en donde (1) es el tubo de subida; (2) es la bajante; (3) es el gas de suministro; (4) es el gas de cola/salida; (5) es el punto donde el gas rico en CO₂ del gas de cola de un reactor separado o del mismo reactor ingresa a la bajante; y (6) es la bomba de bucle que hace circular la mezcla de gas/líquido a través del tubo de subida y la bajante.

El biorreactor

La fermentación puede llevarse a cabo en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de tanque agitado continuo (CSTR), un reactor de células inmovilizadas, un reactor de elevación de gases, un reactor de columna de burbujas (BCR), un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueca (HFM BR) o un reactor de lecho percolador (TBR). También, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer, reactor de crecimiento en el cual se cultivan los microorganismos, y un segundo, reactor de fermentación, al que puede suministrarse caldo de fermentación desde el reactor de crecimiento y que puede producirse la mayor parte del producto de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato). El biorreactor de la presente invención está adaptado para recibir un sustrato que contiene CO y/o H₂.

El sustrato de fermentación

Un sustrato que comprende monóxido de carbono y al menos uno de hidrógeno o dióxido de carbono, se usa en la reacción de fermentación para producir uno o más productos en los métodos de la invención. El sustrato es un sustrato gaseoso. El sustrato gaseoso puede ser un gas residual obtenido como un subproducto de un proceso industrial, o de alguna otra fuente tal como gases de escape de un motor de combustión (por ejemplo, automóviles). En determinados aspectos, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en la fabricación de productos de metales ferrosos, tales como un molino de acero, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinamiento de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbón, producción de amoníaco, la producción de metanol, fabricación de coque y reformado de gas natural. En estos aspectos, el sustrato gaseoso puede capturarse del proceso industrial antes de que se emita a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. Dependiendo de la composición del sustrato gaseoso, también puede ser deseable tratarlo para eliminar cualquier impureza no deseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o lavarse usando métodos conocidos.

En otros casos, el sustrato gaseoso puede proceder de la gasificación de biomasa. El proceso de gasificación implica la combustión parcial de biomasa en un suministro restringido de aire u oxígeno. El gas resultante comprende principalmente CO y H₂, con volúmenes mínimos de CO₂, metano, etileno y etano. Por ejemplo, los subproductos de biomasa obtenidos durante la extracción y el procesamiento de productos alimenticios, tales como azúcar de caña de azúcar o el almidón de maíz o granos, o los residuos de biomasa no alimentaria generados por la industria forestal, pueden gasificarse para producir un gas que contiene CO adecuado para su uso en la presente invención.

El sustrato que contiene CO normalmente contendrá una proporción importante de CO, tal como al menos de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 100 % de CO en volumen, del 40 % al 95 % de CO en volumen, del 40 % al 60 % de CO en volumen y del 45 % al 55 % de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente el 25 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 35 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 45 %, o aproximadamente el 50 % de CO, o aproximadamente el 55 % de CO, o aproximadamente el 60 % de CO en volumen. Los sustratos que tienen concentraciones más bajas de CO, tal como el 6 %, también pueden ser apropiados, particularmente cuando también hay presentes H₂ y CO₂.

Normalmente, el dióxido de carbono se añadirá a la reacción de fermentación en estado gaseoso. Sin embargo, la

invención no debe considerarse limitada a la adición del sustrato en este estado. Por ejemplo, el monóxido de carbono podría proporcionarse en un líquido. Por ejemplo, un líquido puede saturarse con un gas que contiene monóxido de carbono y después ese líquido puede añadirse a un biorreactor. Esto puede conseguirse usando metodología convencional. A modo de ejemplo, puede usarse un generador de dispersión de microburbujas como se describe anteriormente.

En una realización el dióxido de carbono se añade a la fermentación en un estado gaseoso. En un aspecto alternativo, el dióxido de carbono se proporciona como carbonato o bicarbonato.

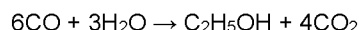
En una realización de la invención, puede usarse una combinación de dos o más sustratos diferentes en la reacción de fermentación.

Además, con frecuencia es deseable aumentar la concentración de CO de una corriente de sustrato (o presión parcial de CO en un sustrato gaseoso) y por lo tanto aumentar la eficiencia de las reacciones de fermentación donde el CO es un sustrato. El aumento de la presión parcial de CO en un sustrato gaseoso aumenta la transferencia de masa de CO a un medio de fermentación. La composición de las corrientes de gas usadas para suministrar a una reacción de fermentación puede tener un impacto significativo sobre la eficiencia y/o los costes de esa reacción. Por ejemplo, el O₂ puede reducir la eficiencia de un proceso de fermentación anaeróbico. El procesamiento de gases no deseados o innecesarios en las fases de un proceso de fermentación antes o después de la fermentación, puede aumentar la carga en dichas fases (por ejemplo, cuando la corriente de gas se comprime antes de entrar en un biorreactor, puede usarse energía innecesaria para comprimir gases que no son necesarios en la fermentación). En consecuencia, puede ser deseable tratar las corrientes de sustrato, particularmente corrientes de sustrato procedentes de fuentes industriales, para retirar componentes no deseados y aumentar la concentración de componentes deseables.

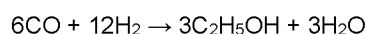
En determinadas realizaciones, se proporciona poco o nada de hidrógeno en el sustrato que contiene CO.

Combinación de corrientes

Puede ser deseable combinar una corriente de sustrato reformado que comprenda CO y H₂ con una o más corrientes adicionales para mejorar la eficiencia, la producción de alcohol y/o la captura general de carbono de la reacción de fermentación. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, las bacterias carboxidotróficas convierten el CO en etanol de acuerdo con la siguiente ecuación:



Sin embargo, en presencia de H₂, la conversión general puede ser la siguiente:



En consecuencia, las corrientes con alto contenido de CO pueden mezclarse con corrientes de sustrato reformadas que comprendan CO y H₂ para aumentar la relación de CO:H₂ para optimizar la eficiencia de la fermentación. A modo de ejemplo, las corrientes de residuos industriales, tales como los gases liberados de una acería, tienen un alto contenido de CO, pero incluyen mínimo o nada de H₂. Como tal, puede ser deseable mezclar una o más corrientes que comprendan CO y H₂ con la corriente residual que comprende CO, antes de proporcionar la corriente de sustrato mezclada al fermentador. La eficacia general, la productividad de alcohol y/o la captura general de carbono de la fermentación, dependerán de la estequiometría del CO y H₂ en la corriente mezclada. Sin embargo, en realizaciones particulares, la corriente mezclada puede comprender sustancialmente CO y H₂ en las siguientes relaciones molares: 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1 o 1:2.

Además, puede ser deseable proporcionar CO y H₂ en relaciones particulares a diferentes fases de la fermentación. Por ejemplo, pueden proporcionarse corrientes de sustrato con un contenido relativamente alto de H₂ (tal como 1:2 CO:H₂) a la fase de fermentación durante el arranque y/o fases de crecimiento microbiano rápido. Sin embargo, cuando la fase de crecimiento se ralentiza, de tal manera que el cultivo se mantenga a una densidad microbiana sustancialmente estacionaria, el contenido de CO puede aumentar (tal como al menos 1:1 o 2:1 o más, en donde la concentración de H₂ puede ser mayor o igual a cero).

La combinación de corrientes también puede tener otras ventajas, particularmente en los casos en que una corriente de desechos que comprende CO es de naturaleza intermitente. Por ejemplo, una corriente de desechos intermitente que comprende CO puede combinarse con una corriente de sustrato reformada sustancialmente continua que comprende CO y H₂ y proporcionarse al fermentador. En realizaciones particulares de la invención, la composición y el caudal de la corriente combinada sustancialmente continua, pueden variar de acuerdo con la corriente intermitente para mantener el abastecimiento de una corriente de sustrato de composición y caudal sustancialmente continuos en el fermentador.

Medios

Se apreciará que, para que se produzca el crecimiento del uno o más microorganismos y sustrato para la fermentación de etanol y/o acetato, además del sustrato, será necesario suministrar al biorreactor un medio nutritivo líquido adecuado. Un medio nutritivo contendrá componentes, tales como vitaminas y minerales, suficientes como para permitir el crecimiento del microorganismo usado. Solamente a modo de ejemplo, los medios anaerobios adecuados para el crecimiento de *Clostridium autoethanogenum* se conocen en la técnica, como se describen, por ejemplo, por Abrini et al (*Clostridium autoethanogenum*, sp. Nov., An Anaerobic Bacterium That Produces Ethanol From Carbon Monoxide; Arch. Microbiol., 161: 345-351 (1994)). La sección de "Ejemplos" del presente documento más adelante proporciona ejemplos adicionales de medios adecuados.

10 Fermentación

Se conocen procesos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos. Los procesos ilustrativos incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en el documento WO2007/117157, el documento WO2008/115080, el documento WO2009/022925, el documento WO2009/064200, el documento US 6340581, el documento US 6136577, el documento US 5593886, el documento US 5.807.722 y el documento US 5.821.111.

Condiciones de fermentación

De manera deseable, la fermentación debe llevarse a cabo en condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación del sustrato a etanol y/o acetato. Las condiciones de reacción que deben tenerse en cuenta incluyen temperatura, caudal de los medios, pH, potencial redox de los medios, velocidad de agitación (en caso de usar un reactor de tanque agitado de flujo continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato y velocidades de introducción del sustrato en el biorreactor para garantizar que el nivel de sustrato no se vuelva limitante, y concentraciones máximas de producto para impedir la inhibición del producto.

Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular usado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se realice a una presión superior a la presión ambiente. El funcionamiento a presiones aumentadas permite un aumento significativo en la tasa de transferencia de CO desde la fase gaseosa a la fase líquida, donde el microorganismo puede absorberlo como fuente de carbono para la producción de etanol. Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen de líquido en el biorreactor dividido entre el caudal de gas de entrada) puede reducirse cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de a presión atmosférica.

También, dado que una tasa de conversión de CO a producto determinada, es en parte una función del tiempo de retención del sustrato, y que a su vez conseguir el tiempo de retención deseado dictamina el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en gran medida el volumen necesario del biorreactor y en consecuencia, el coste de capital del equipo de fermentación. De acuerdo con los ejemplos dados en la patente de EE.UU. N.º 5.593.886, el volumen del reactor puede reducirse en proporción lineal a los aumentos en la presión de funcionamiento del reactor, es decir, los biorreactores que funcionan a 10 atmósferas de presión solamente necesitan tener un volumen de una décima parte del volumen de los que funcionan a 1 atmósfera de presión.

Los beneficios de llevar a cabo una fermentación de gas a producto a presiones elevadas también se han descrito en otra parte. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones de 0,20 MPa (30 psig) y 0,51 MPa (75 psig), proporcionando productividades de etanol de 150 g/l/día y 369 g/l/día, respectivamente. Sin embargo, se descubrió que fermentaciones de ejemplo realizadas usando medios similares y composiciones de gas de entrada a presión atmosférica producían entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

Algunos ejemplos de condiciones de fermentación adecuadas para la fermentación anaerobia de un sustrato que comprende CO se detallan en el documento WO2007/117157, el documento WO2008/115080, el documento WO2009/022925 y el documento WO2009/064200. Se reconoce que las condiciones de fermentación indicadas en dichos documentos pueden modificarse fácilmente de conformidad con los métodos de la presente invención.

Microorganismos

En diversas realizaciones, la fermentación se lleva a cabo usando un cultivo de una o más cepas de microorganismo carboxidotrófico acetogénico. La bacteria carboxidotrófica puede seleccionarse de *Moorella*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyrivacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina* y *Desulfotomaculum*. Se sabe que una serie de bacterias anaerobias son capaces de realizar la fermentación de CO a alcoholes, incluyendo *n*-butanol y etanol, y ácido acético, y son adecuados para su uso en el proceso de la presente invención. Los ejemplos de dichas bacterias que son adecuadas para su uso en la invención incluyen aquellas del género *Clostridium*, tales como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo aquellas descritas en el documento WO 00/68407, el documento EP 117309, las patentes de EE.UU. N.º 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, el documento WO 98/00558 y el documento WO 02/08438, *Clostridium carboxydovorans* (Liou et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33: pp 2085-2091), *Clostridium ragsdalei* (documento WO/2008/028055) y *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al, Archives of Microbiology 161: pp 345-351). Otras bacterias adecuadas incluyen aquellas del género *Moorella*, incluyendo *Moorella* sp HUC22-1, (Sakai et al, Biotechnology Letters 29: pp. 1607-1612),

y las del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G. et al (1991), Systematic and Applied Microbiology 14: 254-260). Los ejemplos adicionales incluyen *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Ruminococcus productus*, *Acetobacterium woodii*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Oxobacter pfennigii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Simpa et. al. Critical Reviews in Biotechnology, 2006 Vol. 26. Pp41-65). Además, ha de entenderse que otras bacterias anaerobias acetógenas pueden ser aplicables a la presente invención como comprendería un experto en la materia. También se apreciará que la invención puede aplicarse a un cultivo mixto de dos o más bacterias.

En una realización, el microorganismo puede seleccionarse del grupo de organismos acetogénicos carboxidotróficos que comprenden las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovate*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Thermoanaerobacter kiuvii*.

Estos acetógenos carboxidotróficos se definen por su capacidad para usar y crecer de manera quimioautótrofa en fuentes gaseosas de un carbono (C1), tal como monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂), con monóxido de carbono (CO) y/o hidrógeno (H₂) como fuente de energía en condiciones anaerobias formando acetil-CoA, acetato y otros productos. Comparten el mismo modo de fermentación, la ruta de Wood-Ljungdahl o acetil-CoA reductora, y se definen por la presencia del conjunto de enzimas que consiste en Monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH), Hidrogenasa, Formiato deshidrogenasa, Formil-tetrahidrofolato sintetasa, Metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, Formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, Metileno-tetrahidrofolato reductasa y Monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (CODH/ACS), cuya combinación es característica y exclusiva de este tipo de bacterias (Drake, Küsel, Matthies, Wood & Ljungdahl, 2006).

A diferencia del crecimiento quimioheterótrofo de bacterias fermentadoras de azúcar que convierten el sustrato en biomasa, metabolitos secundarios y piruvato a partir de los cuales a continuación se forman productos (ya sea a través de acetil-CoA o directamente), en los acetógenos el sustrato se canaliza directamente hacia acetil-CoA, de donde a continuación los productos, la biomasa y los metabolitos secundarios se forman.

En una realización adicional, el microorganismo se selecciona de un grupo de clostridios carboxidotróficos que comprende las especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y "*C. ragsdalei*" y aislados relacionados.

Estos incluyen pero no se limitan a las cepas *C. autoethanogenum* JAI-1^T (DSM10061) (Abrini, Naveau & Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (documento WO/2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC^T (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller & Yang, 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* O-52 (ATCC 55989) (patente de EE.UU. 6.368.819) o "*C. ragsdalei* P11^T" (ATCC BAA-622) (documento WO 2008/028055) y aislados relacionados tales como "*C. coskatii*" (patente de EE.UU. 2011/0229947), "*Clostridium* sp. MT351" (Tyurin & Kiriukhin, 2012), "*Clostridium* sp. MT 653" (Berzin, Kiriukhin & Tyurin, 2012a), "*Clostridium* sp. MT683" (Berzin, 2012), "*Clostridium* sp. MT962" (Berzin, Kiriukhin & Tyurin, 2013), "*Clostridium* sp. MT1121" (Berzin, Kiriukhin & Tyurin, 2012b), "*Clostridium* sp. MT1230" (Kiriukhin & Tyurin, 2013) o "*Clostridium* sp. MT1962" (Berzin, Tyurin & Kiriukhin, 2013) y cepas mutantes de los mismos tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. PhD thesis, North Carolina State University, 2010) o "*Clostridium* sp. MT896" (Berzin, Kiriukhin & Tyurin, 2012c).

Estas cepas forman un subgrupo dentro del grupo I de ARNr de clostridios (Collins et al., 1994), que tiene al menos un 99 % de identidad en el nivel del gen ARNr 16S, aunque son especies distintas según lo determinado por experimentos de reasociación ADN-ADN y huellas de ADN (documento WO 2008/028055, patente de EE.UU. 2011/0229947).

Las cepas de este grupo se definen por características comunes, teniendo ambas un genotipo y un fenotipo similares, y todas comparten el mismo modo de conservación de energía y metabolismo fermentativo. Las cepas de este grupo carecen de citocromos y conservan energía a través de un complejo Rnf.

Todas las cepas de este grupo tienen un genotipo similar con un tamaño de genoma de alrededor de 4,2 Mpb (Köpke et al., 2010) y una composición de GC de alrededor del 32 % mol (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2010; Tanner et al., 1993) (documento WO 2008/028055; patente de EE.UU. 2011/0229947) y operones de genes clave esenciales conservados que codifican enzimas de la ruta de Wood-Ljungdahl (Monóxido de carbono deshidrogenasa, Formil-tetrahidrofolato sintetasa, Metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, Formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, Metileno-tetrahidrofolato reductasa y Monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa, hidrogenasa, formiato deshidrogenasa, complejo Rnf (*mfCDGEAB*), piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, aldehído:ferredoxina oxidoreductasa (Köpke et al., 2010, 2011). La organización y el número de genes de la ruta Wood-Ljungdahl, responsable de la absorción de gases, se ha encontrado que son los mismos en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos (Köpke et al., 2011).

Todas las cepas tienen una morfología y un tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico miden entre 0,5-

0,7 x 3-5 μm), son mesófilas (temperatura de crecimiento óptima entre 30-37 °C) y estrictamente anaerobias (Abrini *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1993) (documento WO 2008/028055). Por otra parte, 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 autotrófico 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 láctico ácido formadas en determinadas condiciones (Abrini *et al.*, 1994; Köpke *et al.*, 2011; Tanner *et al.*, 1993) (documento WO 2008/028055). Se observó producción de indol en todas las especies. Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización del 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 descubrió que algunas de las especies eran auxótrofas a determinadas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina) mientras que otras no lo eran. También se ha demostrado la reducción de ácidos carboxílicos en sus correspondientes alcoholes en una variedad de estos organismos (Perez, Richter, Loftus y Angenent, 2012). Por lo tanto, estos rasgos no son específicos de un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino rasgos generales para clostridios carboxidotróficos sintetizadores de etanol y puede anticiparse que los mecanismos funcionan de manera similar en estas cepas, aunque puede haber diferencias en el rendimiento (Perez *et al.*, 2012).

Un ejemplo de microorganismo adecuado para su uso en la presente invención es *Clostridium autoethanogenum*. En una realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características de identificación de la cepa depositada en el German Resource Centre for Biological Material (DSMZ) bajo el número de depósito identificador 19630. En otra realización, el *Clostridium autoethanogenum* es un *Clostridium autoethanogenum* que tiene las características de identificación del DSMZ número de depósito DSMZ 10061. Estas cepas tienen una tolerancia particular a los cambios en la composición del sustrato, en particular de H₂ y CO y, como tales, son particularmente adecuadas para su uso en combinación con un proceso de reformado con vapor.

Un microorganismo ilustrativo adecuado para su uso en la producción de acetato a partir de un sustrato que comprende CO₂ y H₂ de acuerdo con un aspecto de la presente invención es *Acetobacterium woodii*.

El cultivo de las bacterias usadas en los métodos de la invención puede realizarse usando cualquier número de procesos conocidos en la técnica para cultivar y fermentar sustratos usando bacterias anaerobias. A modo de ejemplo, pueden usarse aquellos procesos que se describen de forma general en los siguientes artículos que usan sustratos gaseosos para la fermentación: (i) K. T. Klasson, *et al.* (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. Conservation and Recycling, 5; 145-165; (ii) K. T. Klasson, *et al.* (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. Fuel. 70. 605-614; (iii) K. T. Klasson, *et al.* (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology. 14; 602-608; (iv) J. L. Vega, *et al.* (1989). Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. Biotech. Bioeng. 34. 6. 785-793; (v) J. L. Vega, *et al.* (1989). Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch culture. Biotechnology and Bioengineering. 34. 6. 774-784; (vi) J. L. Vega, *et al.* (1990). Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. Resources, Conservation and Recycling. 3. 149-160.

Productos de fermentación

Pueden usarse métodos de la invención para producir cualquiera de una diversidad de productos de hidrocarburo. Esto incluye alcoholes, ácidos y/o dioles. Más particularmente, la invención puede ser aplicable a la fermentación para producir butirato, propionato, caproato, etanol, propanol, butanol, 2,3-butanodiol, propileno, butadieno, isobutileno y etileno. En una realización la invención puede usarse para producir alcoholes que incluyen pero no se limitan a propanol y butanol. El alcohol o alcoholes pueden hacerse reaccionar a continuación con acetato para producir productos que incluyen acetato de propilo o acetato de butilo. Un experto en la materia entenderá que la invención no se limita a los alcoholes y productos mencionados, puede usarse cualquier alcohol y/o ácido apropiado para elaborar un producto.

Estos y otros productos pueden ser valiosos para un hospedador de otros procesos tales como la producción de plásticos, productos farmacéuticos y agroquímicos. En una implementación, el producto de fermentación puede usarse para producir hidrocarburos de la gama de la gasolina (aproximadamente 8 carbonos), hidrocarburos de gasóleo (aproximadamente 12 carbonos) o hidrocarburos de combustible para reactores (aproximadamente 12 carbonos).

Los métodos de la invención también pueden aplicarse a fermentaciones aeróbicas, a fermentaciones anaerobias o aeróbicas de otros productos, incluyendo pero no limitado a isopropanol. Los métodos de la invención también pueden aplicarse a fermentaciones aeróbicas y a fermentaciones anaerobias o aeróbicas de otros productos, incluyendo pero no limitado a isopropanol.

La invención también prevé que al menos una porción de un producto hidrocarbonado producido por la fermentación se reutilice en el proceso de reformado con vapor. Esto puede realizarse porque los hidrocarburos distintos del CH₄ son capaces de reaccionar con el vapor sobre un catalizador para producir H₂ y CO. En un aspecto particular, el etanol se recicla para usarse como materia prima para el proceso de reformado con vapor. En un aspecto adicional, la materia prima y/o el producto de hidrocarburos pasan a través de un prerreformador antes de usarse en el proceso de reformado con vapor. El paso a través de un prerreformador completa parcialmente la etapa de reformado con vapor del proceso

de reformado con vapor que puede aumentar la eficiencia de la producción de hidrógeno y reducir la capacidad requerida del horno de reformado con vapor.

Los métodos de la invención también pueden aplicarse a fermentaciones aeróbicas y a fermentaciones anaerobias o aeróbicas de otros productos, incluyendo pero no limitado a isopropanol.

Más particularmente, la invención puede ser aplicable a la fermentación de etanol y/o acetato. Estos productos pueden a continuación reaccionar entre sí para producir productos químicos incluyendo ésteres. En una realización de la invención el etanol y el acetato producidos por fermentación reaccionan juntos para producir Acetato de etilo. El acetato de etilo puede ser valioso para muchos otros procesos tales como la producción de disolventes incluyendo revestimientos de superficies y diluyentes así como en la fabricación de productos farmacéuticos, saborizantes y esencias.

Recuperación de los productos

Los productos de la reacción de fermentación pueden recuperarse usando métodos conocidos. Los métodos ilustrativos incluyen aquellos descritos en el documento WO07/117157, el documento WO08/115080, el documento US 6340581, el documento US 6136577, el documento US 5593886, el documento US 5.807.722 y el documento US 5.821.111. Sin embargo, brevemente y a modo de ejemplo el etanol puede recuperarse del caldo de fermentación mediante métodos tales como destilación fraccionada o evaporación, y fermentación extractiva.

La destilación de etanol a partir de un caldo de fermentación produce una mezcla azeotrópica de etanol y agua (es decir, 95 % de etanol y 5 % de agua). Posteriormente puede obtenerse etanol anhidro a través del uso de tecnología de deshidratación de etanol por tamices moleculares, que también es bien conocida en la técnica.

Los procedimientos de fermentación extractiva implican el uso de un disolvente miscible en agua que presenta un bajo riesgo de toxicidad para el organismo de fermentación, para recuperar el etanol del caldo de fermentación diluido. Por ejemplo, el alcohol oleílico es un disolvente que puede usarse en este tipo de proceso de extracción. El alcohol oleílico se introduce continuamente en un fermentador, después de lo cual este disolvente sube formando una capa en la parte superior del fermentador que se extrae continuamente y se suministra a través de una centrífuga. A continuación el agua y las células se separan fácilmente del alcohol oleílico y se devuelven al fermentador, mientras que el disolvente cargado de etanol se suministra a una unidad de vaporización instantánea. La mayor parte del etanol se evapora y se condensa mientras que el alcohol oleílico no es volátil y se recupera para su reutilización en la fermentación.

El acetato, que puede producirse como un subproducto en la reacción de fermentación, también puede recuperarse del caldo de fermentación usando métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, puede usarse un sistema de adsorción que implica un filtro de carbón activado. En este caso, se prefiere que las células microbianas se retiren primero del caldo de fermentación usando una unidad de separación adecuada. En la técnica se conocen numerosos métodos basados en filtración para generar un caldo de fermentación libre de células para la recuperación del producto. El permeado que contiene etanol y acetato sin células se hace pasar a continuación 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) se adsorbe más fácilmente 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 hacerlo pasar a través de la columna de carbón activado, para convertir la mayor parte del acetato en la forma de ácido acético.

El ácido acético adsorbido en el carbón activado puede recuperarse mediante elución usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse etanol para eluir el acetato unido. En determinadas realizaciones, el etanol producido por el propio proceso de fermentación puede usarse para eluir el acetato. Debido a que el punto de ebullición del etanol es 78,8 °C y el del ácido acético es 107 °C, el etanol y el acetato pueden separarse fácilmente entre sí usando un método basado en la volatilidad tal como la destilación.

También se conocen en la técnica y pueden usarse otros métodos para recuperar acetato de un caldo de fermentación. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.368.819 y 6.753.170 describen un sistema de disolvente y codisolvente que puede usarse para la extracción de ácido acético de caldos de fermentación. Como en el ejemplo del sistema a base de alcohol oleílico descrito para la fermentación extractiva de etanol, los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. N.º 6.368.819 y 6.753.170 describen un disolvente/codisolvente inmiscible en agua que puede mezclarse con el caldo de fermentación en presencia o ausencia de los microorganismos fermentados para extraer el producto de ácido acético. A continuación el disolvente/codisolvente que contiene el producto de ácido acético se separa del caldo por destilación. A continuación puede usarse una segunda etapa de destilación para purificar el ácido acético del sistema disolvente/codisolvente.

Los productos de la reacción de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato) pueden recuperarse del caldo de fermentación retirando de forma continua una porción del caldo del biorreactor de fermentación, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración) y recuperando uno o más productos del caldo simultánea o

secuencialmente. En el caso del etanol puede recuperarse convenientemente por destilación y el acetato puede recuperarse por adsorción sobre carbón activado, usando los métodos descritos anteriormente. Las células microbianas separadas se devuelven preferentemente al biorreactor de fermentación. El permeado sin células que queda después de que se han retirado el etanol y el acetato también se devuelve preferentemente al biorreactor de fermentación. Pueden añadirse nutrientes adicionales (tales como vitaminas B) al permeado sin células para reponer el medio nutritivo antes de que se devuelva al biorreactor. También, si el pH del caldo se ajustó como se describió anteriormente para potenciar la adsorción de ácido acético al carbón activado, el pH debe reajustarse a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de volver a introducirlo al biorreactor.

La biomasa recuperada del biorreactor puede someterse a digestión anaerobia en una digestión para producir un producto de biomasa, preferentemente metano. Este producto de biomasa puede usarse como una materia prima para el proceso de reformado con vapor o puede usarse para producir calor suplementario para impulsar una o más de las reacciones definidas en el presente documento.

Ejemplos

La invención se explicará ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Experimentos de micromatrices

Fermentación

Las fermentaciones con *C. autoethanogenum* DSM23693 se llevaron a cabo en biorreactores de 1,5 l a 37 °C y que contienen CO como única fuente de energía y carbono como se describe a continuación. Un medio líquido definido que contiene por litro: MgCl₂, CaCl₂ (2 mM), KCl (25 mM), H₃PO₄ (5 mM), Fe (100 µM), Ni, Zn (5 µM), Mn, B, W, Mo, Se (2 µM) se usó para el crecimiento del cultivo. El medio se transfirió al biorreactor y se suplementó con una solución de vitamina B y se redujo con una solución de Cr (II) 0,2 mM. Para lograr la anaerobicidad el recipiente del reactor se roció con nitrógeno. Antes de la inoculación, el gas se cambió a una mezcla de gases que contenía 30 % de CO y 70 % de N₂, suministrando continuamente al reactor. El flujo de gas se ajustó inicialmente a 100 ml/min y la agitación a 300 rpm. Se dosificó Na₂S en el biorreactor a 0,3 ml/h. La agitación se aumentó a 900 rpm a intervalos de 50 rpm durante la fase de crecimiento de la fermentación. Después de 0,8 días en el modo discontinuo, el biorreactor se cambió a un modo continuo a una velocidad de líquido de 1,8 ml/min (Tasa de dilución 1,7 d⁻¹). Posteriormente se ajustó el flujo de gas para alcanzar una captación de CO de 4 mol/l/d. El flujo máximo de gas fue de 435 ml/l por volumen de fermentador. Después de alcanzar la fase estable se inició el experimento variando la concentración de CO₂ del 0 % al 25 %. Para evitar cualquier cambio en la absorción de CO, el flujo de CO y el flujo total de gas se mantuvieron constantes mientras se ajustaban los flujos de CO₂ y N₂ entre sí. La composición del gas solo se cambió una vez que se eliminaron el 95 % de los metabolitos del régimen de suministro anterior y los metabolitos se estabilizaron nuevamente en un nuevo nivel durante al menos dos días de tal manera que pudieron extraerse datos para los análisis. Se tomaron muestras de medios para medir la biomasa y los metabolitos y se realizó periódicamente un análisis del espacio de cabeza del gas entrante y saliente.

Procedimiento de muestreo

Las muestras se recogieron del biorreactor usando tubos previamente enfriados; la cantidad de muestra recolectada fue equivalente a DO 2, medido a 600 nm. Se recogieron tres muestras del biorreactor para el análisis de micromatrices para comparar la composición del gas y el efecto del tiempo sobre el perfil de expresión genética con respecto a diferentes proporciones EtOH:BDO. La primera muestra se recolectó de una mezcla de gases de CO 30 % y N₂ 70 % y una relación EtOH:BDO de 23:1 presente en el reactor. La segunda muestra se tomó de una mezcla de gases de CO 30 %, N₂ 40 % y CO₂ 30 % con relación EtOH:BDO de 13:1, esta muestra se recogió 7 h después de que se modificó la composición del gas. La tercera muestra se recogió de la misma mezcla de gases que la segunda muestra, pero con una relación EtOH:BDO de 4:1, esta muestra se recogió 3 días después de la adición de CO₂ a la composición del gas. Tras la recogida, las muestras se centrifugaron a 4000 RPM durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, posteriormente, el sedimento se congeló rápidamente en N₂ líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Extracción de ARN

Después de la recuperación de muestras a -80 °C, las muestras se extrajeron usando el kit RiboPure™-Bacteria (Ambion, número de parte AM1925).

Análisis de micromatrices

Roche realizó el análisis de micromatrices usando técnicas convencionales

Ejemplo 2: Los efectos de la presión sobre la fermentación

La Figura 2, la Figura 3 y la Figura 4 muestran los resultados de las fermentaciones realizadas tanto a baja como a alta presión, para demostrar los efectos tanto en la cantidad de CO₂ disuelto presente en el caldo de fermentación como en la concentración de metabolitos producidos por la fermentación. En cada uno de estos experimentos se inoculó un biorreactor que contenía un medio nutritivo líquido con un cultivo de *Clostridium autoethanogenum*. Se proporcionó al biorreactor un sustrato gaseoso que comprendía CO y CO₂.

La Figura 2 muestra los resultados de un primer experimento, en donde la fermentación se realizó a diferentes presiones, para determinar el efecto de la presión sobre la cantidad de CO₂ disuelto y sobre la concentración de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) producido en el reactor.

La Figura 2 muestra que a alta presión desde los días 0-6 (320 kPag en el espacio de cabeza del reactor y aproximadamente 420 kPag en el fondo del reactor) tanto la cantidad de CO₂ disuelto en el caldo de fermentación como la concentración de 2,3-BDO producido aumentaron. Cuando la fermentación se realizó a baja presión desde los días 6-22 (50 kPag en el espacio de cabeza y aproximadamente 150 kPag en el fondo), tanto la cantidad de CO₂ disuelto en el caldo de fermentación como la concentración de 2,3-BDO disminuyeron.

La Figura 3 demuestra claramente la correlación entre la cantidad de CO₂ disuelto en el caldo de fermentación y la concentración de 2,3-butanodiol.

La Figura 4 demuestra el efecto de la conversión de CO a CO₂ en la fermentación. Cuando la fermentación se realizó de tal manera que la cantidad de CO consumido por las bacterias aumentó, el CO₂ se produjo como un subproducto de la fermentación. La conversión de CO en CO₂ por la CODH (dióxido de carbono deshidrogenasa) creó ferredoxina reducida. Se requieren altos niveles de ferredoxina reducida para convertir el acetil CoA en piruvato, lo que resultó en un aumento en la producción de 2,3-butanodiol y un aumento en la producción de otros productos derivados del piruvato.

Ejemplo 3: Aumento de las concentraciones de CO₂ disuelto.

Se realizó un conjunto de experimentos que demostraron que el nivel de CO₂ disuelto en la fermentación resultó en una producción aumentada de 2,3-butanodiol.

3A: Cambios en la concentración de entrada de CO₂ como una forma de aumentar la producción de 2,3 BDO

Durante este experimento la concentración de CO₂ del gas de entrada al caldo de fermentación se modificó del 0 % al 25 % en una sola etapa después de 28 días de funcionamiento. La absorción de CO se mantuvo constante durante todo el experimento y la concentración de CO se mantuvo en 30 % en el gas de entrada. Como se muestra en la Figura 5 se observó un gran aumento en la producción de 2,3-butanodiol cuando el CO₂ se cambió del 0 % al 25 %.

La Figura 6 muestra los cambios en la concentración de CO₂ en el caldo de fermentación entre los días 25-31. En el día 25 la cantidad de CO₂ en la corriente de entrada suministrada a la fermentación fue del 0 %. El día 28 la concentración de CO₂ de la corriente de entrada se aumentó al 25 %. La Figura 6 muestra claramente que la absorción de CO se mantuvo igual después del aumento de CO₂, lo que indica que el aumento en la producción de BDO que se detalla a continuación no puede explicarse por una mayor entrada de carbono al sistema. Además, la producción de CO₂ se mantuvo igual después del aumento. La Figura 5 demuestra claramente los cambios correspondientes en la producción de metabolitos de la fermentación. Cuando se añadió CO₂ al caldo de fermentación, la concentración de 2,3-BDO aumentó de una concentración de aproximadamente 0,6 g/l en el día 28 a 2,0 g/l en el día 31. La concentración de etanol disminuyó y la relación etanol/2,3-BDO bajó de aproximadamente 20:1 el día 20 a aproximadamente 5:1 el día 31.

3B: Alta concentración de entrada de CO₂ al arranque

Este experimento fue diseñado para mostrar el impacto de una alta concentración de CO₂ en la producción de 2,3-BDO cuando CO₂ estuvo presente al inicio de la fermentación. Como se muestra en la Figura 7, una vez alcanzadas las condiciones de funcionamiento estables se produjo una producción significativa de 2,3-BDO con el etanol: relación de 2,3-BDO: 2:1. La concentración promedio de CO₂ en la entrada fue del 42 % y la concentración promedio de CO₂ en la salida fue del 67,4 %. A lo largo de todo el experimento se usó 50 % de CO y el flujo de gas y la absorción de CO se ajustaron para maximizar la producción de etanol y 2,3-BDO. La concentración de CO, CO₂ y H₂ en la corriente de gas de salida a lo largo de varios días se muestra en la Figura 8.

3C: Aumento gradual de la concentración de entrada de CO₂

Durante la duración de este experimento, la concentración de CO₂ en la corriente de gas de entrada al caldo de fermentación se incrementó gradualmente para determinar el efecto del CO₂ en el perfil de producción de metabolitos de la fermentación. La Figura 10 muestra el efecto del aumento de CO₂ en la corriente de entrada sobre las concentraciones de metabolitos. La concentración de CO₂ se aumentó del 0 % al 10 % el día 6; del 10 % al 15 % el día 9 y del 15 % al 20 % el día 13. Con cada aumento de la concentración de CO₂ en la corriente de entrada se observó

un aumento correspondiente en la concentración de 2,3-BDO. La Figura 9 muestra la absorción de CO, CO₂ y H₂ del cultivo microbiano a lo largo del experimento.

3D: Ciclo del CO₂

Este experimento se realizó para determinar el efecto del ciclo de la concentración de entrada de CO₂. La fermentación se configuró de tal manera que la cantidad de CO₂ en la corriente de entrada variará entre el 0 % y el 20 % cada hora. La Figura 11 muestra la producción de metabolitos a lo largo del transcurso del experimento. El ciclo de las concentraciones de entrada de CO₂ tuvo el efecto de mantener la producción de 2,3-BDO en una concentración ligeramente mayor. La Figura 12 muestra la absorción de varios componentes del gas de entrada por el cultivo microbiano a lo largo del experimento.

3E: Aumento de la concentración de CO₂ en el segundo reactor de un sistema de dos reactores.

Este experimento se diseñó para demostrar el efecto de pasar la corriente de gas de salida de un primer biorreactor a la corriente de entrada de un segundo biorreactor, aumentando de este modo la concentración de CO₂. La Figura 13 muestra gráficos de la concentración de metabolitos en el segundo biorreactor del sistema de dos reactores entre los días 14 y 20 del proceso de fermentación. El día 14 se aumentó la cantidad de CO₂ suministrada al segundo biorreactor desde el primer biorreactor de tal manera que la cantidad total de CO₂ en el segundo biorreactor pasó del 17,8 % al 43,8 %. Entre los días 14 y 21, la concentración de 2,3-BDO en el reactor aumentó de aproximadamente 8 g/l a aproximadamente 14 g/l. La relación de etanol a 2,3-BDO disminuyó de 4:1 el día 14 a 2:1 alrededor del día 20 y se mantuvo relativamente constante durante el resto del experimento. La Figura 14 muestra la absorción de CO, CO₂ y H₂ para el cultivo microbiano a lo largo del transcurso de la fermentación.

Ejemplo 4: Aumento de la producción de 2,3-BDO mediante el control de la utilización de CO.

Demostración del efecto del flujo de gas y la agitación en la producción de metabolitos.

Este experimento fue diseñado para demostrar el efecto de los cambios en la transferencia de masa en la producción de metabolitos de un cultivo microbiano. Durante el transcurso del experimento, se variaron las tasas de agitación y el flujo de gas dando como resultado cambios en el gas que salía del reactor y en el perfil de metabolitos de la fermentación.

Con referencia a la Figura 15, puede observarse un aumento en la concentración de 2,3-BDO desde el día 6 al día 8, correspondiente a un aumento en la tasa de agitación dentro del biorreactor y una disminución en el flujo de gas al reactor. Como se muestra en la Figura 18, el día 5,6 la captación de CO se mantuvo constante pero la utilización de CO mejoró, por lo tanto el CO₂ en el gas de salida aumentó. Esto se logró aumentando la velocidad de agitación (rpm) y disminuyendo el flujo de gas para que el CO en el gas de salida disminuyera del 26 % al 12,5 %. La absorción de CO se mantuvo igual ya que el flujo de gas se redujo de 240 ml/min/l a 160 ml/min/l. El CO₂ en el flujo de salida aumentó del 37 % al 48 %. La utilización de CO aumentó del 53 % al 79 %. Como resultado de este aumento el CO₂ disuelto aumentó sin ningún aumento en la absorción de CO. El aumento en la utilización de CO se correlacionó positivamente con un aumento en la producción de 2,3-BDO, ya que una mayor utilización de CO se corresponde con más CO₂ disuelto.

Efecto del CO₂ disuelto en el caldo de fermentación sobre la tasa de productividad de 2,3-butanodiol.

Se trazaron los datos combinados de varias series con diferentes concentraciones de CO₂ a diferentes presiones en el espacio de cabeza para mostrar la relación entre el CO₂ disuelto en el caldo de fermentación y la producción de 2,3-butanodiol. La Figura 16 es un gráfico del CO₂ disuelto frente a la tasa de producción de 2,3-BDO. El gráfico muestra que un aumento en la cantidad de CO₂ disuelto en el caldo de fermentación corresponde a un aumento en la tasa de productividad del 2,3-butanodiol.

La Tabla presenta los resultados de una serie de experimentos que muestran de nuevo la correlación entre la concentración de CO₂ y de 2,3-BDO disueltos y la productividad.

La Tabla

| N.º de ejecución | CO ₂ disuelto Calc. mM* | % de salida de CO ₂ | BDO g/l | % de entrada de CO ₂ | Captación de CO mM/l/día | Puntos de datos | BDO normalizado g/l (captación de 4 moles de CO) | Tasa de producción g/l/día | Tasa de producción normalizada (captación de 4 moles de CO) |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--|----------------------------------|---|
| 1 | 2,39 | 10,62 | 0,5 | 0 | -4280 | Promedio ~ 3 días | 0,47 | 0,92 | 0,86 |
| 2 | 4,58 | 20,3 | 0,88 | 10 | -4201 | Promedio ~ 3 días | 0,84 | 1,6 | 1,52 |
| 3 | 5,76 | 25,5 | 0,96 | 15 | -4234 | Promedio ~ 3 días | 0,91 | 1,71 | 1,62 |
| 4 | 7 | 31,1 | 1,37 | 20 | -4071 | Promedio ~ 3 días | 1,35 | 2,58 | 2,54 |
| 5 | 8,5 | 37 | 0,86 | 18,5 | -3587 | Promedio ~ 3 días | 0,96 | 1,36 | 1,51 |
| 6 | 11,05 | 49 | 1,38 | 18,8 | -3595 | Promedio ~ 3 días | 1,54 | 2,18 | 2,43 |
| 7 | 14,89 | 66 | 2,22 | 50 | -4055 | Antes del choque | 2,19 | 3,89 | 3,84 |
| 8 | 26,1 | 50 | 5,3 | 19,2 | -5000 | Promedio día 9 - 12 | 4,24 | 8 | 8,40 |
| 9 | 39,7 | 498 | 10,38 | 20,5 | -5051 | Promedio día 4,3 - 6,0 | 8,22 | 13,3 | 10,53 |
| 10 | 40,9 | 48 | 6,48 | 18,5 | -6500 | Promedio día 7-8 | 3,99 | 13,75 | 8,46 |
| 11 | 41,1 | 46 | 10,38 | 22,3 | -5319 | Promedio día 6,3 - 9,3 | 7,81 | 13,4 | 10,08 |

La invención se ha descrito en el presente documento con referencia a determinadas realizaciones preferidas, para permitir al lector llevar a la práctica la invención sin excesiva experimentación. Los expertos en la materia apreciarán que la invención es susceptible de invención e incluye todas esas variaciones y modificaciones.

- 5 A lo largo de esta memoria descriptiva y de cualquiera de las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprender", "que comprende" y similares, deben interpretarse en un sentido inclusivo en lugar de exclusivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no se limita a".

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar el perfil metabólico de un cultivo de fermentación que comprende al menos un microorganismo acetogénico carboxidotrófico, comprendiendo el método:
 - a. hacer fluir un sustrato gaseoso que comprende CO y CO₂ a un biorreactor que comprende un cultivo del microorganismo en un medio nutritivo líquido para producir al menos un producto derivado de acetil CoA y al menos un producto derivado de piruvato; y
 - b. ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido en donde un aumento de la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido da como resultado una relación aumentada de productos derivados de piruvato con respecto a los productos derivados de acetil CoA y una disminución de la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido da como resultado una relación disminuida de productos derivados del piruvato con respecto a los productos derivados del acetil CoA;en donde el al menos un producto derivado del piruvato se selecciona del grupo que consiste en 2,3-butanodiol, lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol e isobutanol.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un producto derivado de piruvato es 2,3-butanodiol, y el al menos un producto derivado de acetil CoA es etanol.
3. El método de la reivindicación 1 o 2 en donde la cantidad de CO₂ disuelto en el medio se aumenta de tal manera que se aumenta la producción de al menos un producto derivado de piruvato.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la concentración de CO₂ en una corriente de gas de entrada está entre el 0-10 % y el etanol y el butanodiol se producen en una proporción de entre 30:1 y 20:1.
5. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la cantidad de CO₂ disuelto en el medio se disminuye de tal manera que se disminuye la producción de al menos un producto derivado de piruvato.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la concentración de CO₂ en una corriente de gas de entrada está entre el 10-65 % y el etanol y el 2, 3-butanodiol se producen en una proporción de entre 20:1 y 1:1.
7. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la cantidad de CO₂ disuelto en el medio se ajusta controlando el flujo de CO₂ al biorreactor.
8. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la presión parcial del CO₂ se ajusta para ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido.
9. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la fermentación se lleva a cabo a una presión de más de 250 kPag de tal manera que la concentración de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido se aumenta.
10. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la fermentación se lleva a cabo a una presión de menos de 200 kPag de tal manera que la concentración de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido se reduce.
11. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración de CO₂ en el sustrato gaseoso proporcionado al biorreactor es del 15 % al 65 %.
12. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración de CO₂ en el sustrato gaseoso proporcionado al biorreactor se aumenta gradualmente con el tiempo.
13. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además monitorizar la concentración de CO₂ en una corriente de salida que sale del biorreactor para monitorizar la cantidad de CO₂ utilizado por el cultivo dentro del biorreactor.
14. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en el medio nutritivo líquido controla la proporción de productos derivados de piruvato y productos derivados de acetil CoA.
15. El método de la reivindicación 1 en donde un gas de salida que comprende CO₂ de una salida del biorreactor se recicla a una entrada del biorreactor.

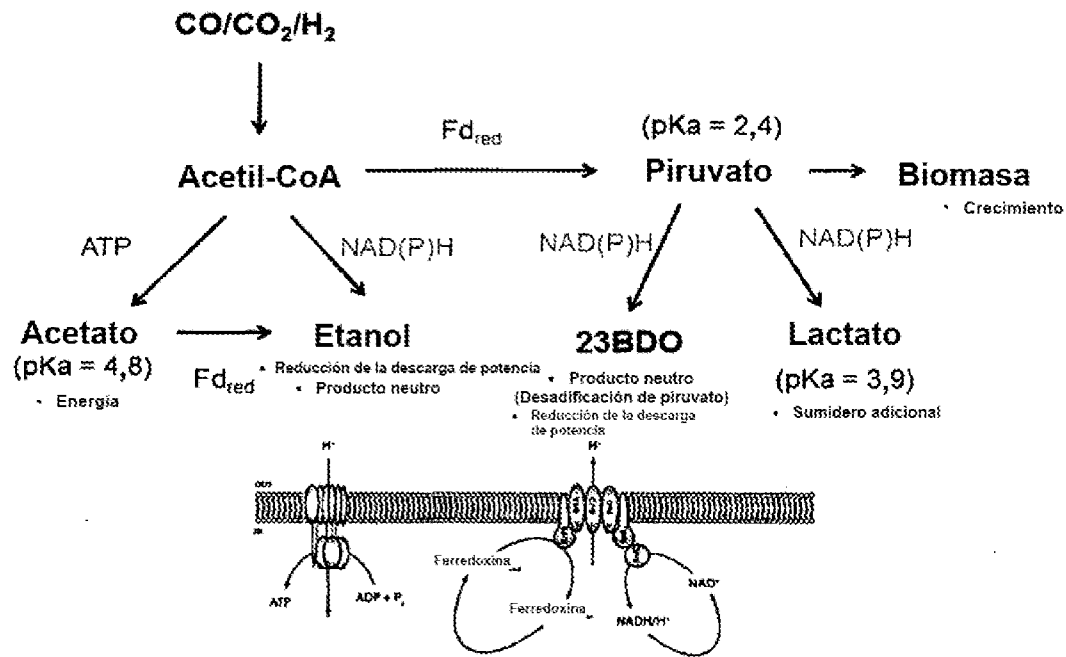


FIG. 1

Comparación de presión alta y baja

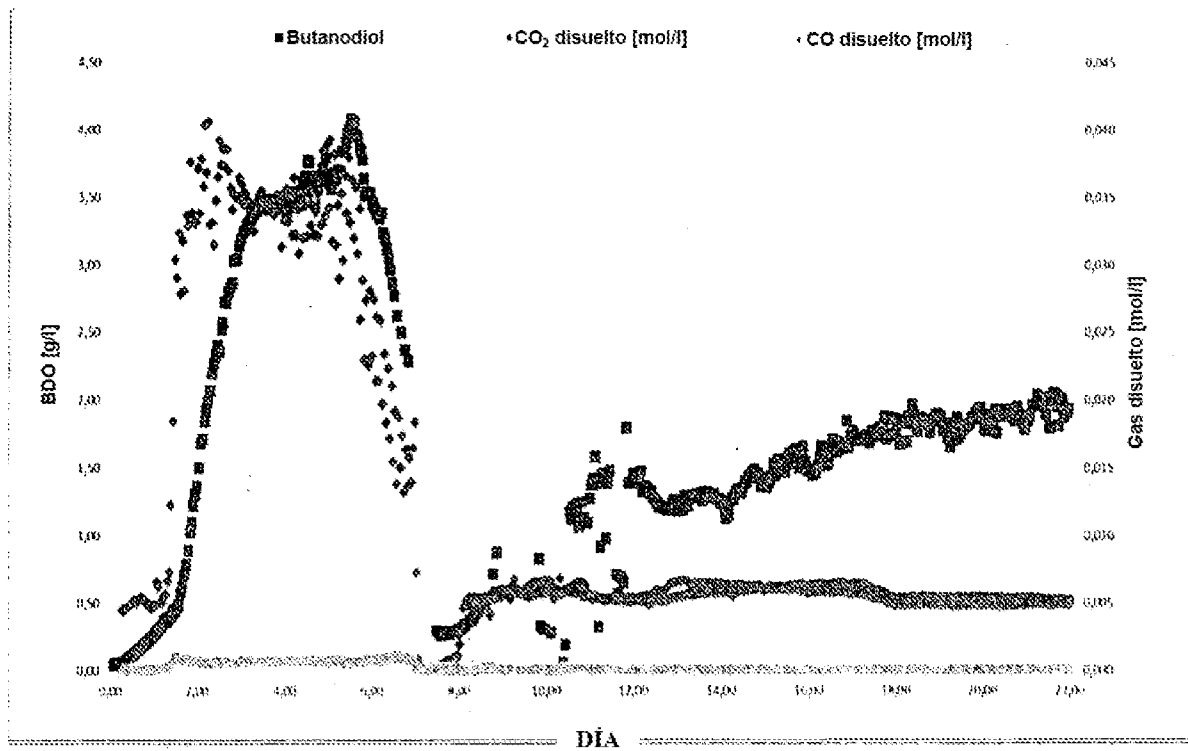


FIG. 2

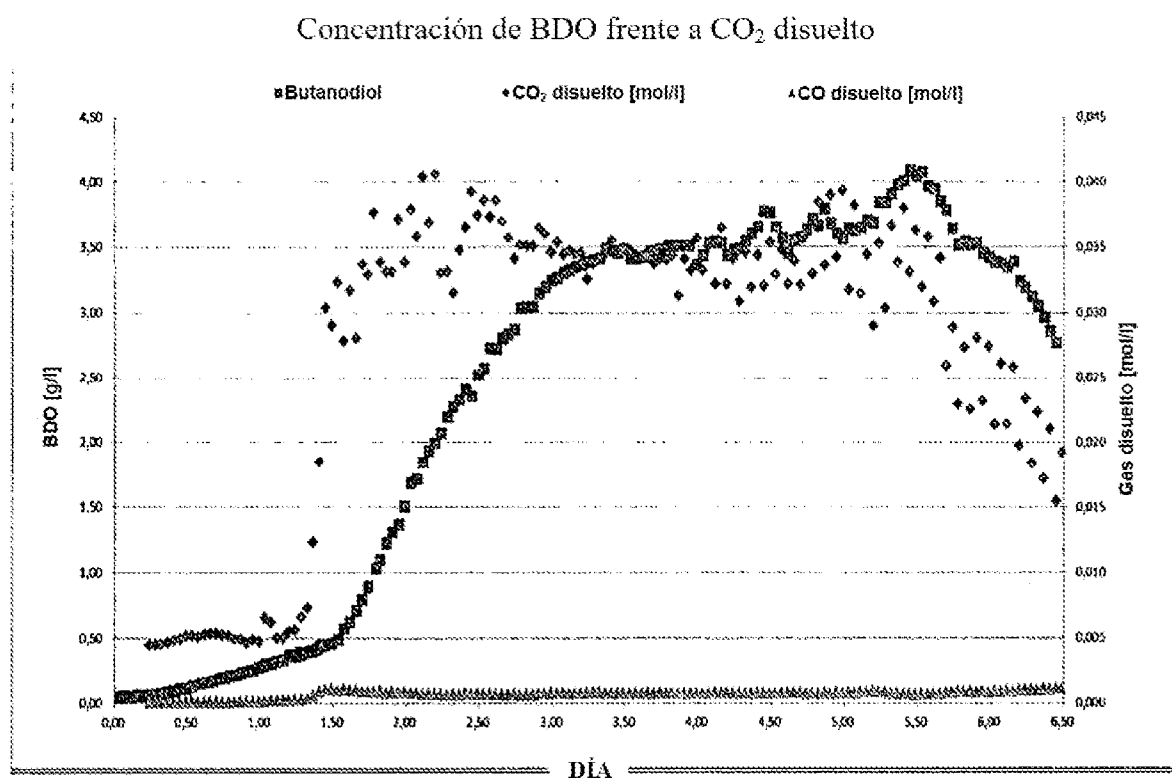


FIG. 3

Utilización de CO

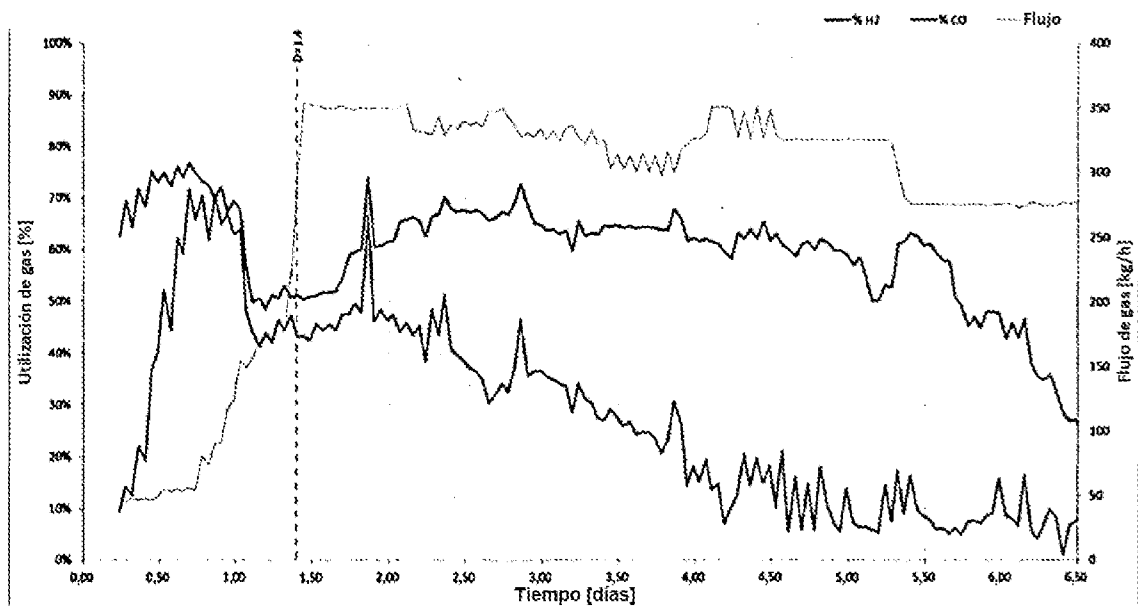


FIG.4

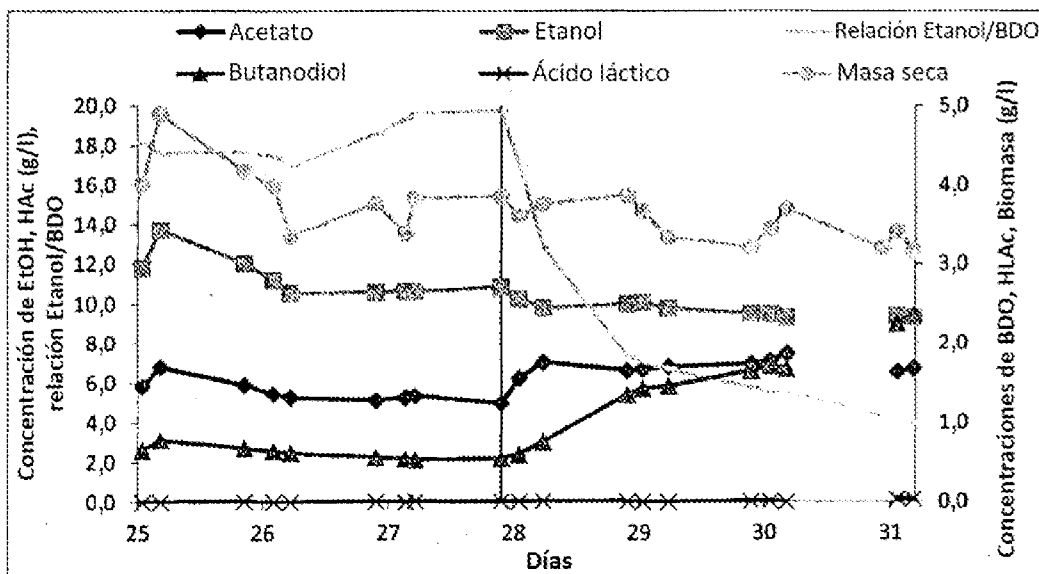
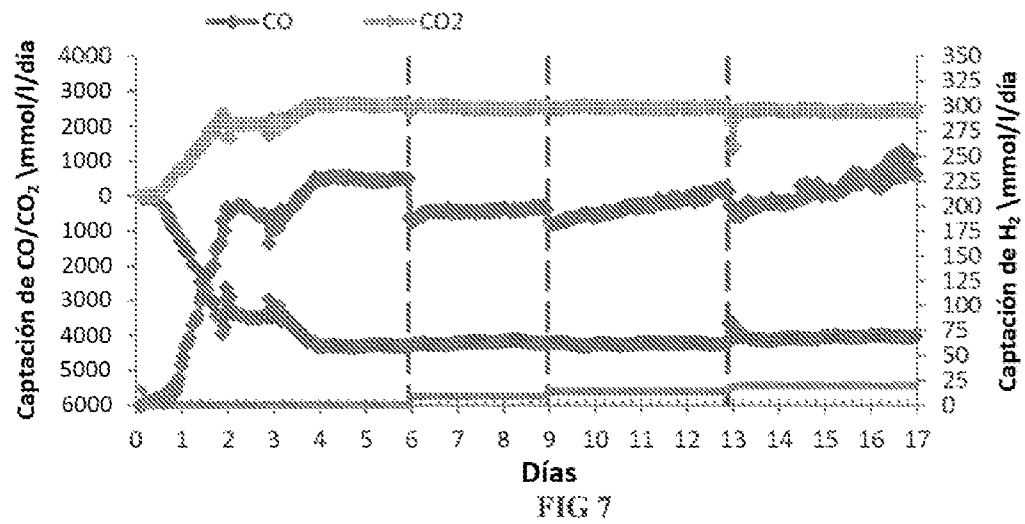
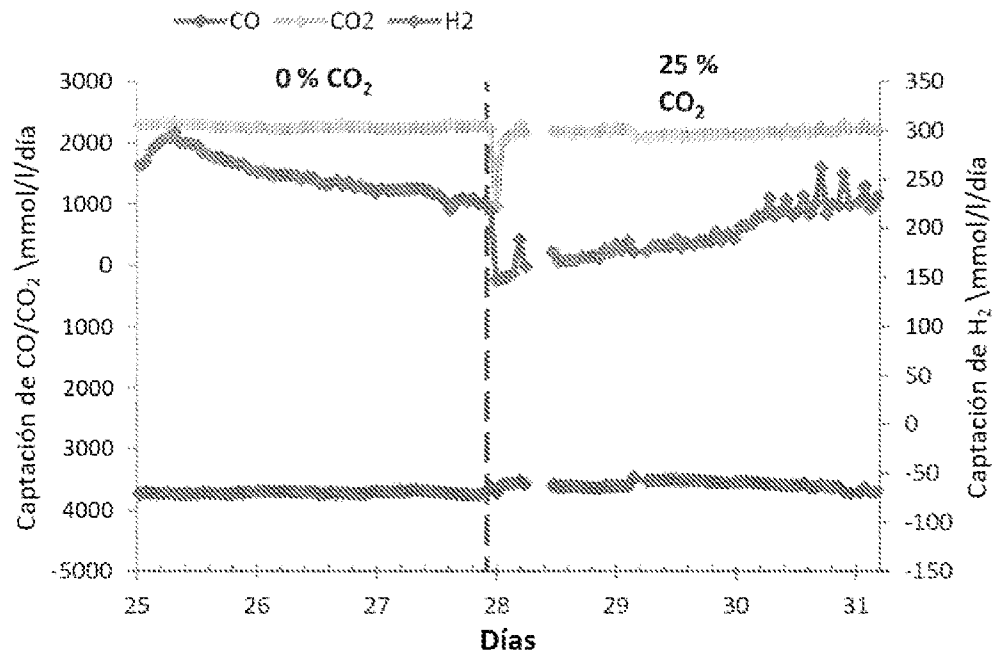


FIG. 5



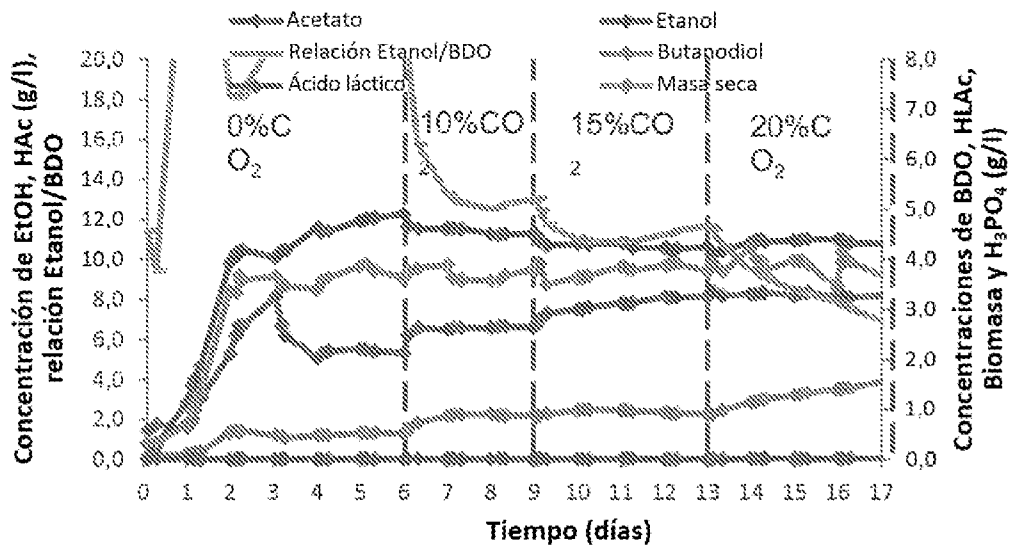


FIG 8

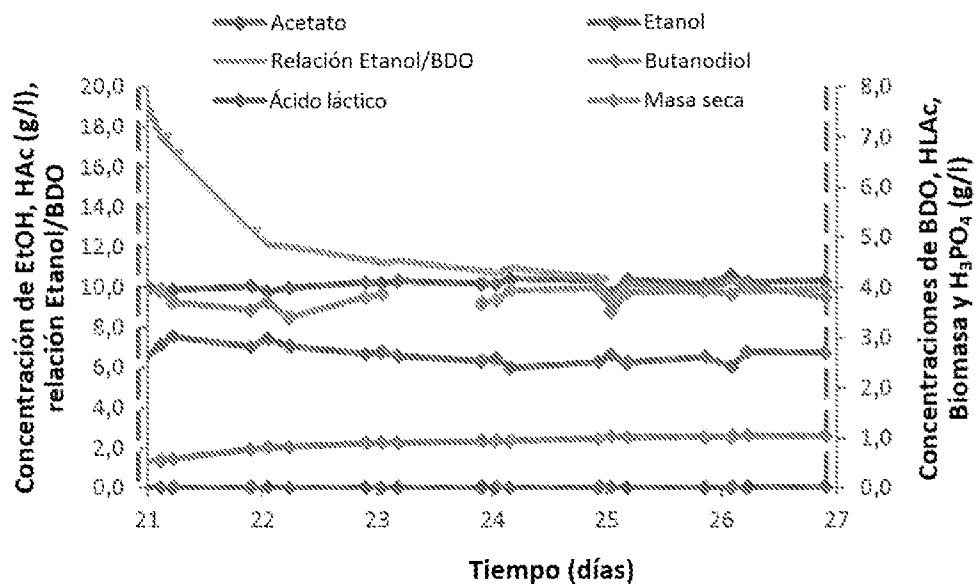


FIG 9

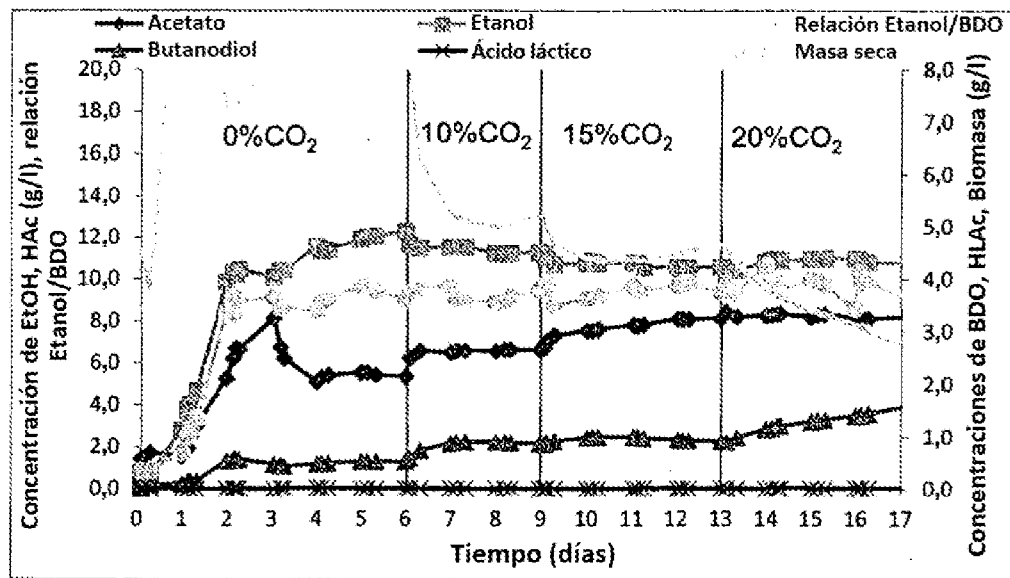


FIG. 10

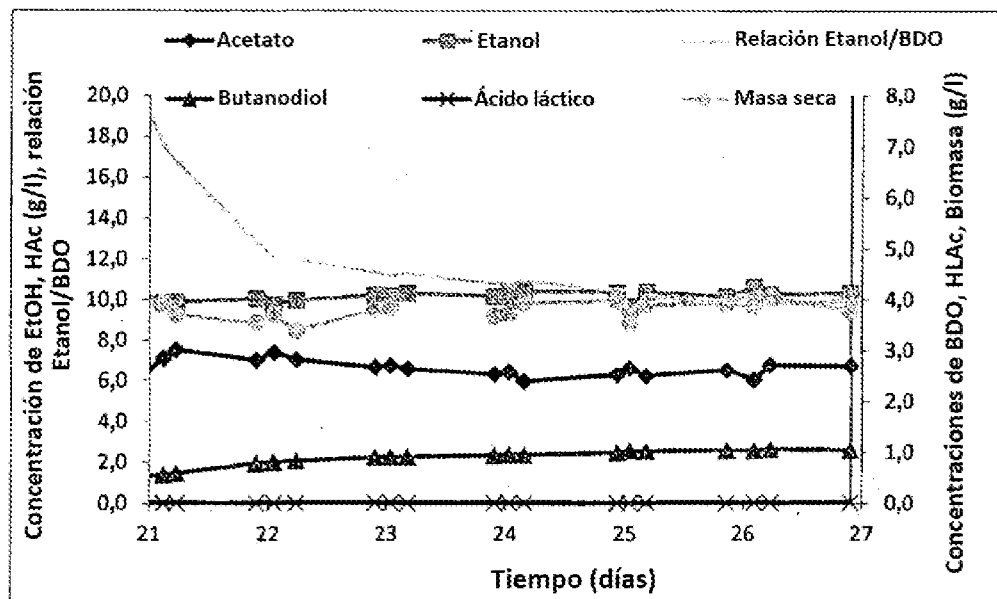


FIG. 11

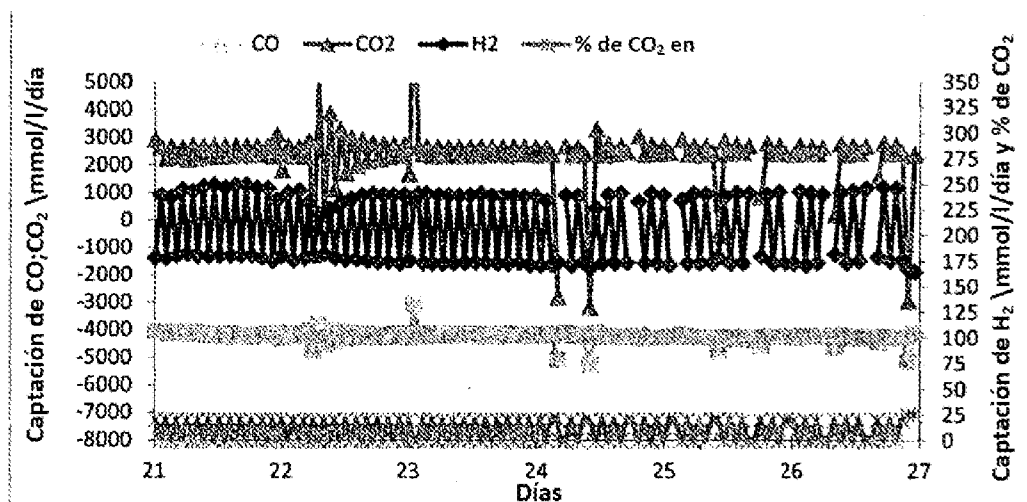


FIG. 12

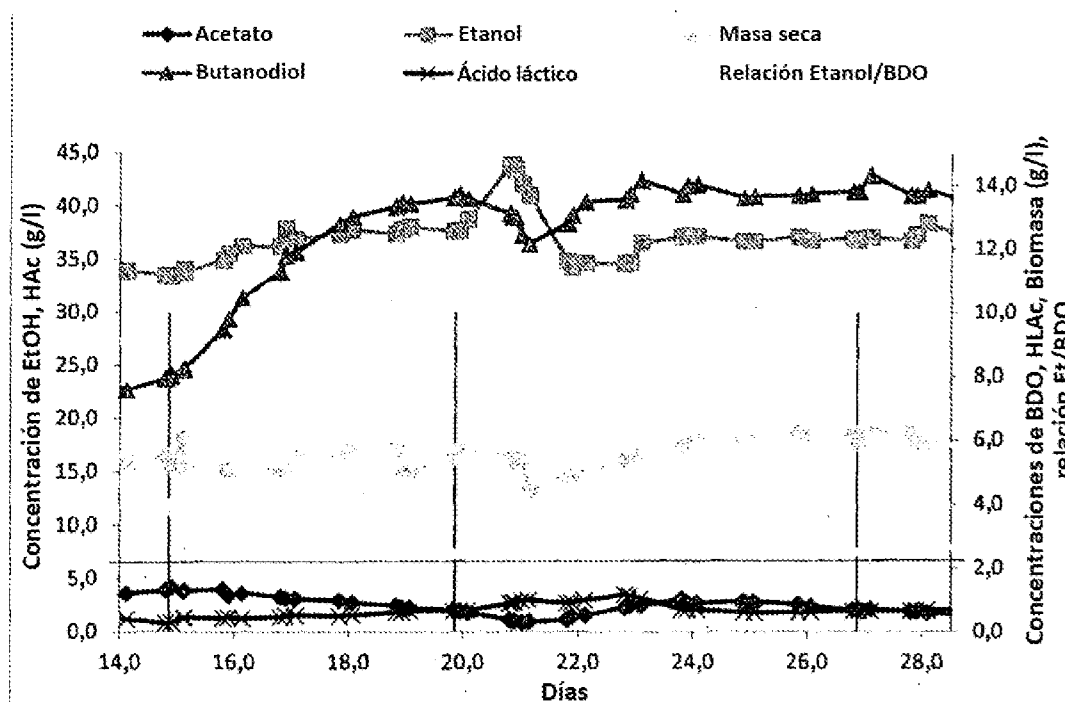


FIG. 13

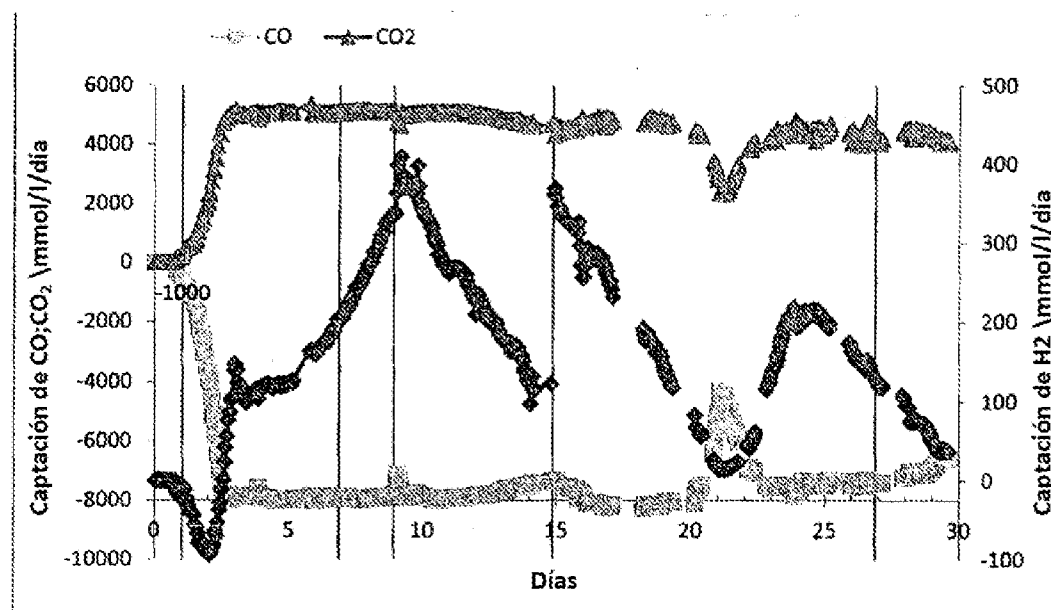


FIG. 14

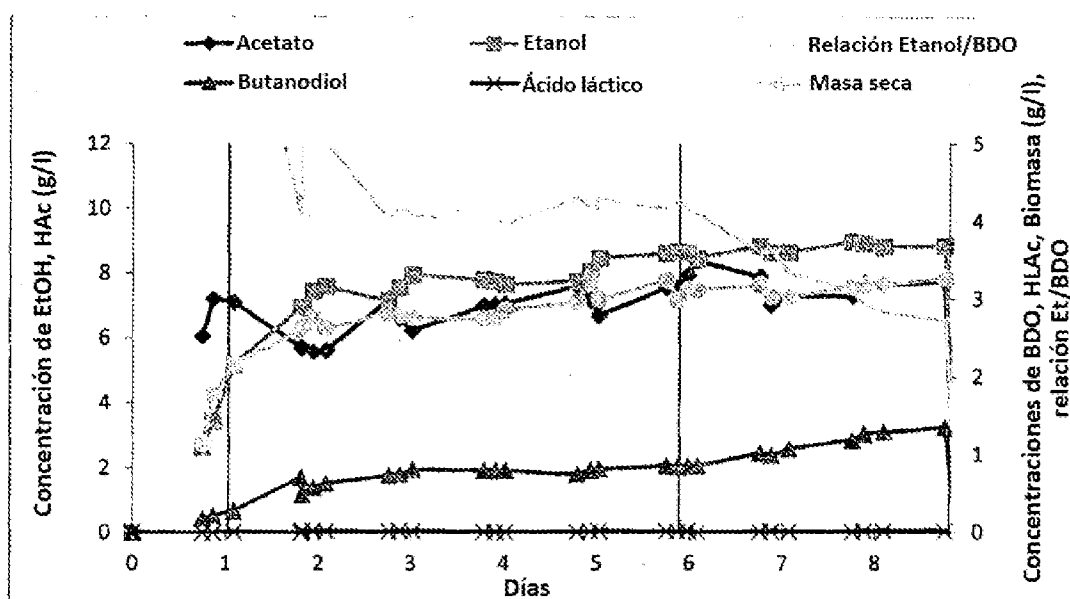


FIG. 15

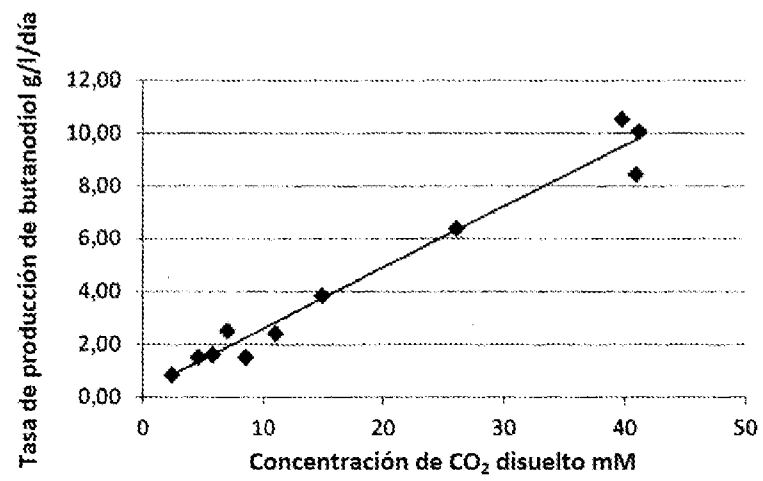


FIG. 16

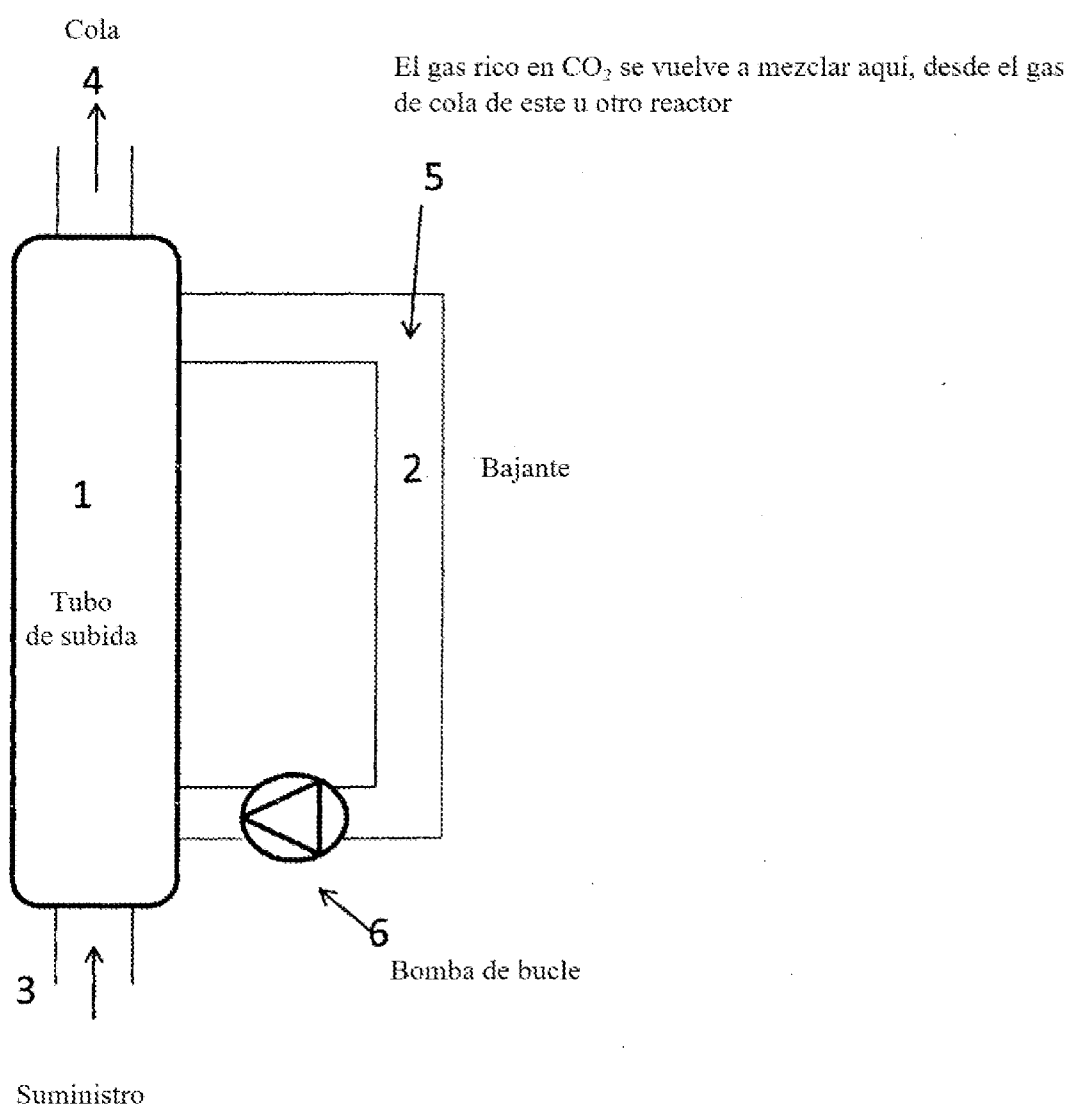


FIG. 17

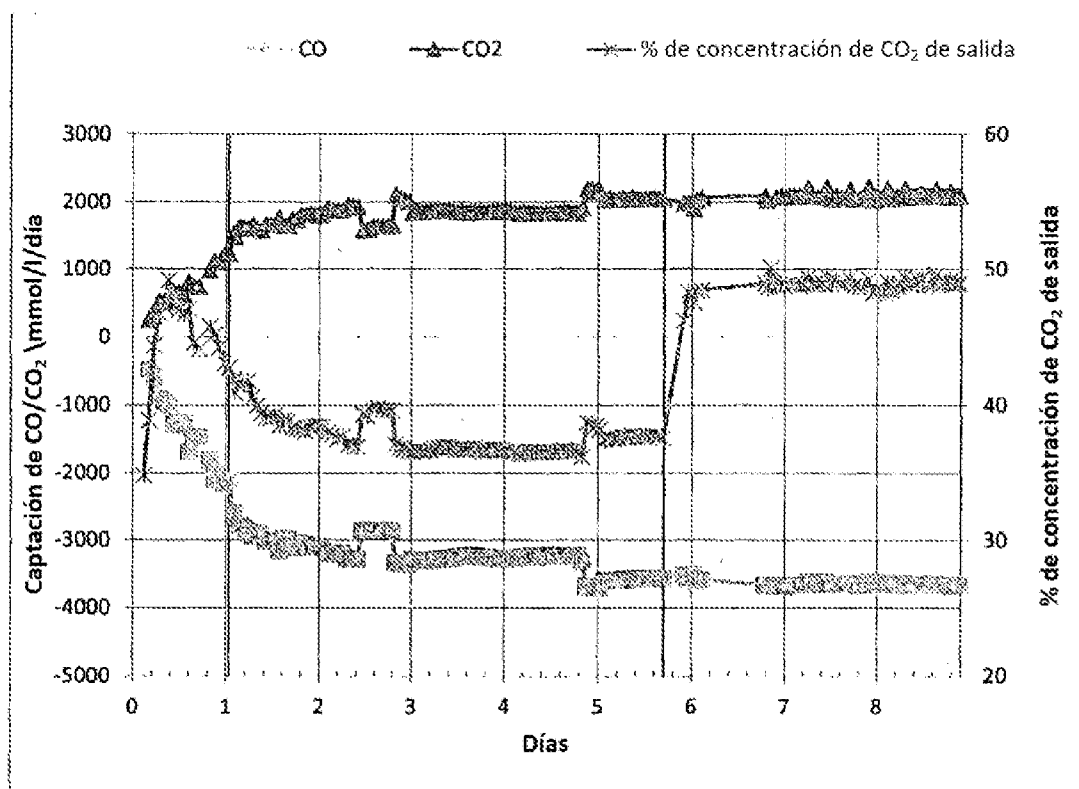


FIG. 18