

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 094**

51 Int. Cl.:

<b>C12P 7/06</b>	(2006.01) <b>C12P 7/64</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/16</b>	(2006.01) <b>C12P 5/02</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/26</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/30</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/40</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/42</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/46</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/54</b>	(2006.01)	
<b>C12P 7/56</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2015 PCT/US2015/031857**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15179578**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2015 E 15796360 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3146058**

54 Título: **Proceso de fermentación para la producción y control de productos derivados de piruvato**

30 Prioridad:

**21.05.2014 US 201414283287**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.04.2021**

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)  
Level 11, 41 Shortland Street  
Auckland 1010, NZ**

72 Inventor/es:

**SMART, KATHLEEN FRANCES y  
LY, BOI SAN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 818 094 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso de fermentación para la producción y control de productos derivados de piruvato

5 **Campo**

La presente invención se refiere a métodos para alterar el perfil de metabolitos de un sistema de fermentación mediante el ajuste de la concentración de nutrientes clave en un medio nutritivo líquido. En particular, la invención se refiere a métodos para aumentar la producción de 2,3-butanodiol en un proceso de fermentación.

10

**Antecedentes de la invención**

Los biocombustibles para transporte son sustitutos atractivos de la gasolina y se están introduciendo rápidamente en los mercados de combustibles como mezclas de baja concentración. Los biocombustibles, derivados de fuentes vegetales naturales, son más ecológicamente sostenibles que los derivados de los recursos fósiles (como la gasolina), su uso permite una reducción en los niveles del denominado gas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) fósil, que se libera a la atmósfera como resultado de la combustión del combustible. Además, los biocombustibles se pueden producir localmente en muchas zonas geográficas y pueden actuar para reducir la dependencia de los recursos energéticos fósiles importados. Los alcoholes adecuados para su uso como biocombustibles incluyen etanol, butanol y 2,3-butanodiol.

15

20

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 10,8 mil millones de galones. También se espera que el mercado global de la industria del etanol carburante crezca considerablemente en el futuro, debido a un mayor interés en el etanol en Europa, Japón, Estados Unidos y diversas naciones en desarrollo.

25

Se considera que los butanodiolos, incluido el 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol y el 2,3-butanodiol, tienen diversas ventajas sobre el etanol. Al igual que el etanol, los butanodiolos pueden usarse directamente como un aditivo de combustible para automóviles. También pueden transformarse con relativa facilidad en diversos otros productos de valor posiblemente más alto y/o de mayor energía. Por ejemplo, el 2,3-butanodiol puede convertirse fácilmente, mediante un proceso de dos etapas, en un dímero de ocho carbonos que puede utilizarse como combustible de aviación.

30

La versatilidad del 2,3-butanodiol proviene de su estructura principal difuncional, es decir, 2 grupos hidroxilo se encuentran en átomos de C adyacentes permitiendo que la molécula se transforme muy fácilmente en sustancias tales como butadieno, butadiona, acetoína, metilil cetona etc. Estos compuestos químicos se utilizan como moléculas base para fabricar una amplia gama de productos químicos producidos industrialmente.

35

Además, el 2,3-butanodiol puede usarse como combustible en un motor de combustión interna. En muchos sentidos, es más similar a la gasolina que al etanol. Como el interés en la producción y aplicación de combustibles ecológicamente sostenibles se ha fortalecido, ha aumentado el interés en los procesos biológicos para producir 2,3-butanodiol (a menudo denominado biobutanol).

40

El monóxido de carbono (CO) es un subproducto importante de la combustión incompleta de materiales orgánicos como el carbón o el petróleo y productos derivados del petróleo. Aunque la combustión completa de precursores que contienen carbono produce CO<sub>2</sub> y agua como únicos productos finales, algunos procesos industriales necesitan temperaturas elevadas que favorezcan la acumulación de monóxido de carbono sobre CO<sub>2</sub>. Un ejemplo es la industria del acero, donde se necesitan altas temperaturas para generar las calidades de acero deseadas. 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.

45

50

Adicionalmente, el CO también es un componente importante de gas de síntesis (o Sintegas), donde se generan cantidades variables de CO y H<sub>2</sub> por gasificación de un combustible que contiene carbono. Por ejemplo, el gas de síntesis puede producirse mediante el craqueo de la biomasa orgánica de maderas de desecho y de madera para generar precursores para la producción de combustibles y productos químicos más complejos.

55

La liberación de CO a la atmósfera puede tener un impacto medioambiental significativo. Además, se puede exigir el pago de impuestos sobre las emisiones, lo que aumenta los costes de las plantas industriales. Como el CO es una molécula rica en energía reactiva, se puede utilizar como compuesto precursor para la producción de una variedad de productos químicos. Sin embargo, esta valiosa materia prima no se ha utilizado para producir 2,3-butanodiol.

60

Se ha demostrado que el 2,3-butanodiol puede producirse por fermentación microbiana de materia prima que contiene carbohidratos (Syu MJ, Appl Microbiol Biotechnol 55: 10-18 (2001), Qin et al., Chino J Chem Eng 14 (1): 132-136 (2006)). El 2,3-butanodiol también puede producirse por fermentación microbiana de biomasa de cultivos como la remolacha azucarera, maíz, trigo y caña de azúcar. Sin embargo, el coste de estas reservas de carbohidratos depende de su valor como alimento humano o animal y el cultivo de plantas productoras de almidón o sacarosa para la

65

producción de 2,3-butanodiol no es económicamente sostenible en todas las zonas geográficas. Por lo tanto, es interesante desarrollar tecnologías para convertir los recursos de carbono de bajo coste y/o más abundantes en 2,3-butanodiol.

5 Se ha demostrado la producción de 2,3-butanodiol por fermentación microbiana de sustratos gaseosos que comprenden CO. Sin embargo, la producción de 2,3-butanodiol mediante estos procesos ha sido un producto secundario. La producción de otros productos, incluido el etanol, se favorece en la fermentación. El butanodiol tiene mayor valor que los otros productos producidos en dichas fermentaciones. Es deseable poder repercutir sobre la fermentación de tal manera que se aumente la producción de 2,3-butanodiol. Anteriormente se ha demostrado que el  
10 aumento de la productividad de 2,3-butanodiol estaba influenciado por una tasa de consumo de hidrógeno por un cultivo microbiano (documento WO2012131627).

El documento de patente WO 2013/176556 desvela un método para aumentar la producción de al menos un producto derivado de piruvato durante la fermentación microbiana que comprende:

15 a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprenda CO, a un biorreactor que comprenda un cultivo de al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico en un medio nutritivo líquido para producir al menos un producto derivado de piruvato y al menos un producto derivado de acetil-CoA, y  
20 b) aumentar la concentración de al menos un nutriente en el microorganismo de tal manera que aumente la producción de al menos un producto derivado de piruvato,

seleccionándose dicho nutriente del grupo que consiste en:

25 1) vitamina B1,  
2) vitamina B5 y  
3) vitamina B7,

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.

30 Las concentraciones de vitamina B1, vitamina B5, vitamina B7 en el microorganismo, aumentan al aumentar la biosíntesis de dichos nutrientes en dicho microorganismo

35 Sigue existiendo la necesidad en la técnica de aumentar la capacidad de producir productos valiosos a partir de sustratos gaseosos industriales de maneras económicamente beneficiosas. Existe la necesidad de mejorar la producción de 2,3-butanodiol en relación con la producción de otros productos que se producen habitualmente en la fermentación de sustratos gaseosos mediante bacterias carboxidotróficas.

#### 40 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una respuesta a la necesidad en la técnica. La presente invención proporciona métodos para controlar la producción de productos derivados de piruvato por fermentación microbiana de sustratos gaseosos. La presente invención proporciona además métodos para aumentar la producción de productos derivados de piruvato en relación con productos derivados de acetil-CoA. En realizaciones particulares, se proporciona un  
45 método para aumentar la producción de 2,3-butanodiol en relación con otros productos de fermentación tales como etanol y ácido acético.

Se proporciona un método para aumentar la producción de al menos un producto derivado de piruvato durante la fermentación microbiana, comprendiendo el método:

50 a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprenda CO a un biorreactor que comprenda un cultivo de al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico en un medio nutritivo líquido para producir al menos un producto derivado de piruvato y al menos un producto derivado de acetil-CoA; y  
55 b) aumentar la concentración de al menos un nutriente en el medio nutritivo líquido a una concentración por encima de las necesidades celulares del al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico de manera que aumente la producción de al menos un producto derivado de piruvato, seleccionándose dicho nutriente del grupo que consiste en:

60 1) vitamina B1;  
2) vitamina B5;  
3) vitamina B7 y

mezclas de las mismas, y en donde

65 (a) la concentración de vitamina B1 en el medio nutritivo líquido varía de 20 a 500 mg/g de biomasa producida;  
o

(b) la concentración de vitamina B5 en el medio nutritivo líquido varía de 100 a 4 000 mg/g de biomasa producida; o

(c) la concentración de vitamina B7 en el medio nutritivo líquido varía de 100 a 4 000 mg/g de biomasa producida.

5 En realizaciones particulares, la concentración de al menos un nutriente en el medio nutritivo líquido aumenta para aumentar la producción de al menos un producto derivado de piruvato.

10 En realizaciones particulares, la concentración de vitamina B5 o vitamina B1 aumenta de 2 a 80 veces por encima de las necesidades celulares del al menos un microorganismo.

En otra realización particular, la concentración de vitamina B7 aumenta en el medio líquido de 2 a 30 veces por encima de las necesidades celulares del al menos un microorganismo.

15 En realizaciones particulares, el aumento de la concentración de vitamina B1, B5 o B7, o una mezcla de las mismas, en el medio nutritivo líquido, no aumenta la densidad de la biomasa en el biorreactor.

20 En una realización, el al menos un producto derivado de piruvato es 2,3-butanodiol (2,3-BDO). De manera alternativa, el al menos un producto derivado de piruvato se selecciona del grupo que consiste en lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, acetoína, isobutanol, citramalato, butadieno y ácido poliláctico (PLA). En una realización, el al menos un producto derivado de acetil-CoA se selecciona del grupo que consiste en etanol, ácido acético, acetona, butanol, isobutileno, 3-hidroxiopropionato (3HP) y ácidos grasos. En realizaciones adicionales, el al menos un producto derivado de acetil-CoA es etanol.

25 En realizaciones particulares, el aumento de al menos un nutriente en el medio nutritivo líquido, disminuye la relación de etanol: 2,3-butanodiol al aumentar la producción de 2,3-BDO. En realizaciones particulares, la relación de etanol a 2,3-BDO varía de 4: 1 a 1: 1.

30 En realizaciones particulares, la concentración de al menos un nutriente en el medio nutritivo líquido aumenta de tal manera que el microorganismo produce 2,3-butanodiol a una velocidad de producción de al menos 10 g/l al día o al menos 20 g/l al día o al menos 30 g/l al día.

35 En realizaciones particulares, el microorganismo carboxidotrófico acetogénico se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*. En diversas realizaciones, el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

40 En realizaciones particulares, el microorganismo carboxidotrófico acetogénico es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum*. En realizaciones particulares, la bacteria tiene las características de identificación de los números de registro DSM10061, DSM19630 o DSM23693. Estas bacterias se han depositado en el *German Resource Centre for Biological Material* (DSMZ) cuya dirección es DSMZ GmbH Inhoffenstraße, 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania.

### Breve descripción de los dibujos

50 Estos y otros aspectos de la presente invención, que deben considerarse novedosos en todos sus aspectos, se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción, que se ofrece solo como ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

55 La figura 1 proporciona una representación esquemática de la ruta de producción de etanol y 2,3-butanodiol en *Clostridium autoethanogenum* e ilustra donde se utilizan las vitaminas B1, B5 y B7 como cofactores.

La Figura 2 presenta gráficos de las concentraciones de metabolitos y biomasa del ejemplo 2.

La Figura 3 presenta gráficos que muestran el perfil de absorción de gas del experimento 2.

60 La Figura 4 presenta gráficos de las concentraciones de metabolitos y biomasa frente al tiempo del ejemplo 4.

La Figura 5 presenta gráficos que muestran la absorción de gas del ejemplo 4.

### Descripción detallada de la invención

65 Los inventores han ideado métodos para controlar los productos metabólicos producidos por un cultivo de al menos

un microorganismo carboxidotrófico acetogénico. En particular, la presente invención proporciona métodos para aumentar la producción de al menos un producto derivado de piruvato mediante la fermentación microbiana de un sustrato de CO gaseoso mediante al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico.

## 5 Definiciones

La expresión "2,3-butanodiol" o 2,3-BDO debe interpretarse que incluye todas las formas enantioméricas y diastereoméricas del compuesto, incluidas 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 torres o tuberías, que incluye el reactor de tanque agitado de flujo continuo (CSTR, *Continuous Stirred Tank Reactor*), el reactor de células inmovilizadas (ICR, *Immobilized Cell Reactor*), el reactor de lecho percolador (TBR, *Trickle Bed Reactor*), columna de burbujeo, fermentador de elevación de gases, mezclador estático, un reactor de circuito circulante, un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueca (HFM BR, *Hollow Fibre Membrane Bioreactor*) u otro recipiente u otro dispositivo adecuado 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.

El término "nutriente" incluye cualquier sustancia que pueda utilizarse en una ruta metabólica de un microorganismo. Como ejemplos de nutrientes se incluyen potasio, vitaminas B, oligoelementos metálicos y aminoácidos.

La expresión "sustrato gaseoso" y/o "sustrato" incluye cualquier gas que contenga un compuesto o elemento utilizado por un microorganismo como fuente de carbono y opcionalmente fuente de energía en la fermentación. El sustrato gaseoso contendrá normalmente una proporción significativa de cualquiera de CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> o mezclas de los mismos.

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

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, un porcentaje de al menos 15 % a 95 % de CO por volumen.

Un "sustrato que comprende CO<sub>2</sub>" 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 CO<sub>2</sub> puede proporcionarse disuelto en un líquido. Básicamente, un líquido se satura con un gas que contiene dióxido de carbono y después ese líquido se añade al biorreactor. Esto puede realizarse utilizando metodología estándar. Como ejemplo, podría utilizarse 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). Como ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> puede adsorberse sobre un soporte sólido.

El término "producto" como se usa en el presente documento, pretende abarcar sustancias producidas por la fermentación microbiana. El producto puede incluir alcoholes, ácidos u otros productos químicos. Los productos también pueden incluir gases producidos por el proceso de fermentación microbiana.

Las expresiones "que aumenta la eficacia", "eficacia aumentada" y similares, cuando se utilizan en relación a un proceso de fermentación, incluyen, pero sin limitación, aumentar uno o más de la tasa de crecimiento de microorganismos que catalizan la fermentación, la tasa de crecimiento y/o 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.

Los términos "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. La productividad volumétrica se expresa como g/l/día.

A menos que el contexto requiera lo contrario, las frases "fermentando", "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.

La expresión "productos derivados de piruvato" o "productos derivados a partir 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 sin limitación, 2,3-butanodiol, lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, acetoína, isobutanol, citramalato, butadieno y ácido poliláctico (PLA).

La expresión "productos derivados de acetil CoA" o "productos derivados a partir de acetil CoA", o expresiones similares, como se usan en el presente documento, pretenden abarcar productos de fermentación que tienen un precursor de acetil CoA. Estos productos incluyen, pero sin limitación, etanol, ácido acético, acetona, butanol, isobutileno, 3-hidroxipropionato (3HP) y ácidos grasos.

En la siguiente descripción, el 2,3-BDO se utiliza como un ejemplo de un producto derivado de piruvato, mientras que el etanol se utiliza como un ejemplo de un producto derivado de acetil CoA. Debe entenderse que la invención no se limita a estos dos productos específicos, sino que abarca todos los productos derivados de piruvato y acetil CoA enumerados anteriormente.

Los procesos para la fermentación microbiana de sustratos gaseosos que comprenden monóxido de carbono para producir productos tales como etanol y acetato son muy conocidos en la técnica. Dichos procesos proporcionan un medio para producir combustibles comercialmente útiles a partir de gases residuales industriales que comprenden CO. Estos procesos generalmente implican suministrar un sustrato gaseoso que comprende CO a un biorreactor que comprende un cultivo de al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico en un medio nutritivo líquido. El sustrato gaseoso se fermenta anaeróticamente para producir alcoholes, ácidos y mezclas de los mismos. El medio nutritivo líquido utilizado en el biorreactor, contiene normalmente varios nutrientes que mantienen el crecimiento del al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico y se utilizan en rutas metabólicas del uno o más microorganismos para producir alcoholes. Como ejemplos de dichos nutrientes se incluyen MgCl, CaCl, KCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Fe, Ni, Zn, Mn, B, W, Se, etc.

También se sabe que el 2,3-BDO puede producirse a varias concentraciones (generalmente a una concentración mucho más baja que el etanol) junto con el etanol. En determinados casos, puede ser deseable producir la mayor cantidad de 2,3-BDO posible, mientras que en otros casos puede ser deseable producir la mayor cantidad de etanol posible. De manera sorprendente, los inventores han descubierto que al aumentar las concentraciones de nutrientes específicos en el medio nutritivo líquido, ya sea al inicio de la fermentación o en un punto posterior durante la fermentación, se altera el perfil de metabolitos de la fermentación de tal manera que la producción de productos derivados de piruvato, por ejemplo, el 2,3-BDO, aumenta sin afectar prácticamente a la producción de productos derivados de acetil CoA, por ejemplo, etanol. Aunque el efecto se ha observado principalmente con 2,3-BDO y etanol, no hay razón para dudar de que otros productos derivados de piruvato y productos derivados de acetil CoA no se vean afectados de manera similar. Los nutrientes específicos que se ha comprobado que aumentan los productos derivados de piruvato cuando se suministran en exceso de las necesidades celulares necesarios para el crecimiento y la producción de productos, se seleccionan del grupo formado por:

- 1) vitamina B1;
- 2) vitamina B5;
- 3) vitamina B7 y mezclas de las mismas.

La invención implica ajustar, es decir, aumentar la concentración de vitamina B en el medio nutritivo líquido por encima de las necesidades celulares de los microorganismos acetogénicos carboxidotróficos. El aumento de los niveles de vitaminas B1 y B5, dos vitaminas B esenciales para el metabolismo de *Clostridium autoethanogenum*, tiene el efecto de aumentar la producción de 2,3-BDO. Estas vitaminas se han identificado como cofactores clave para las enzimas implicadas en la biosíntesis de productos intermedios en la producción de 2,3-BDO, incluyendo acetil CoA, piruvato y acetolactato. En la **figura 1** se ilustra el papel de las vitaminas B como cofactores.

En la técnica se enseña que los microorganismos carboxidotróficos, tales como *Clostridium ljungdahlii*, requieren 50 mg/g de biomasa producida de vitamina B5 para el crecimiento (por ejemplo, documento WO 2002/08438). Se ha demostrado que al aumentar la concentración de vitamina B5 o B1 en los medios nutrientes líquidos de 2 a 80 veces (o más) por encima de las necesidades celulares, aumenta la producción de productos derivados de piruvato. En realizaciones particulares, la concentración de vitamina B5 en el medio nutritivo líquido puede aumentar de 2 a 80 o de 2 a 60 o de 2 a 40 o de 2 a 30 o de 2 a 20 o de 2 a 10 o de 4 a 80 o de 4 a 60 o de 4 a 40 o de 4 a 30 o de 4 a 20 o de 4 a 15 o de 4 a 10 o de 8 a 80 o de 8 a 60 o de 8 a 40 o de 8 a 30 o de 8 a 20 o de 15 a 80 o de 15 a 60 o de 15 a 40 o de 15 a 30 o de 25 a 80 o de 25 a 60 o de 25 a 40 o de 80 o de 40 a 60 veces las necesidades celulares. En términos de concentración real, una realización amplia de la invención es aquella en la que la concentración de vitamina B5 en el medio nutritivo líquido es de 100 mg/g de biomasa producida a 4 000 mg/g de biomasa producida. En realizaciones particulares, la concentración de vitamina B5 en el medio nutritivo líquido es de 100 a 3 000 o de 100 a 2 000 o de 100 a 1 500 o de 100 a 1 000 o de 200 a 4 000 o de 200 a 3 000 o de 200 a 2 000 o de 200 a 1 500 o de 200 a 1 000 o de 400 a 4 000 o de 400 a 3 000 o de 400 a 2 000 o de 400 a 1 500 o de 600 a 4 000 o de 600 a 3 000 o de 600 a 2 000 mg/g de biomasa producida.

En el caso de la vitamina B1, una realización amplia de la invención es aquella en la que la concentración de vitamina

B1 en el medio nutritivo líquido aumenta de 2 a 80 veces las necesidades celulares. En términos de concentración real, una realización amplia de la invención es aquella en la que la concentración de vitamina B1 en el medio nutritivo líquido es de 20 a 500 mg/g de biomasa producida. En realizaciones particulares, la concentración de vitamina B1 en el medio nutritivo líquido puede variar de 20 a 400 o de 20 a 300 o de 20 a 200 o de 40 a 500 o de 40 a 300 o de 40 a 200 o de 60 a 500 o de 60 a 400 o de 60 a 300 o de 60 a 200 o de 100 a 500 o de 100 a 400 o de 100 a 300 o de 100 a 200 mg/g de biomasa producida.

Los inventores han demostrado que el aumento de la concentración de vitamina B7 en el medio nutritivo líquido da como resultado una mayor producción de 2,3-BDO. Este aumento se debe al aumento de la disponibilidad de precursores metabólicos. La vitamina B7 se requiere para la actividad de acetil-CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa. Sorprendentemente, los inventores han demostrado que al aumentar la concentración de vitamina B7, tal como proporcionar B7 en exceso con respecto a las necesidades celulares del microorganismo, aumenta la producción de 2,3-BDO. Curiosamente, se ha demostrado que el aumento de B7 no afecta a la producción de biomasa o a la absorción de CO. En realizaciones particulares, la concentración de vitamina B7 en el medio nutritivo líquido puede aumentar de 2 a 30 o de 2 a 20 o de 2 a 15 o de 2 a 10 o de 4 a 20 veces o de 4 a 15 o de 4 a 10 veces las necesidades celulares. En realizaciones particulares, la concentración de vitamina B7 en el medio nutritivo líquido puede variar de 100 a 4 000 o de 100 a 3 000 o de 100 a 2 000 o de 100 a 1 500 o de 100 a 1 000 o de 200 a 4 000 o de 200 a 3 000 o de 200 a 2 000 o de 200 a 1 500 o de 200 a 1 000 o de 400 a 4 000 o de 400 a 3 000 o de 400 a 2 000 o de 400 a 1 500 o de 600 a 4 000 o de 600 a 3 000 o de 600 a 2 000 mg/g de biomasa producida. El aumento de la concentración de vitamina B7 en el medio nutritivo líquido mejora la relación entre etanol:2,3-BDO a favor de 2,3-BDO.

Cuando cualquiera de las vitaminas B se aumenta por encima de las necesidades celulares (como se describió anteriormente), la producción y la concentración de productos derivados de piruvato, por ejemplo, 2,3-BDO, aumenta, mientras que la producción o concentración de productos derivados de acetil CoA, por ejemplo, etanol, prácticamente no se ve afectada. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es que la relación de etanol: 2,3-BDO, puede controlarse a un determinado valor o intervalo ajustando la concentración de al menos una de las vitaminas B dentro de los intervalos establecidos anteriormente. En consecuencia, la relación de etanol: 2,3-BDO puede variar de 4: 1 a 1: 1 o de 4: 1 a 2: 1 o de 3: 1 a 1: 1 o de 3: 1 a 2: 1 consiguiéndose relaciones más bajas (mayor concentración/producción de 2,3-BDO) a mayores concentraciones de vitamina B.

En realizaciones particulares, la concentración de al menos un nutriente en el medio nutritivo líquido aumenta por encima de las necesidades celulares al comienzo del proceso de fermentación y se mantiene en la concentración en exceso, es decir, por encima de las necesidades celulares durante todo el proceso. De manera alternativa, el proceso de fermentación se inicia utilizando un medio nutritivo líquido que comprende concentraciones estándar de nutrientes, y la concentración de nutrientes aumenta a una concentración deseada por encima de las necesidades celulares en un momento específico durante el proceso de fermentación. También se ha descubierto que, cuando la concentración del al menos un nutriente disminuye de la concentración por encima de las necesidades celulares con respecto a la de las necesidades celulares o en algún punto intermedio, se reduce la producción de 2,3-BDO. En el caso donde la concentración se reduce a la concentración de las necesidades celulares, la producción de 2,3-BDO vuelve sustancialmente a la producción inicial. Por lo tanto, la presente invención permite adaptar la producción de productos derivados de piruvato, por ejemplo, 2,3-BDO y de productos derivados de acetil CoA, por ejemplo, etanol, durante todo el proceso de fermentación o durante varios períodos de tiempo. Esto es especialmente importante si los productos de fermentación, por ejemplo, 2,3-BDO y etanol, se usan para producir otros compuestos químicos tales como butadieno o combustibles, por ejemplo, combustible para aviones.

La fermentación de sustratos gaseosos que comprenden CO por microorganismos carboxidotróficos acetogénicos conduce a la producción de etanol como producto primario de fermentación a concentraciones relativamente altas, y a la producción de concentraciones relativamente bajas de 2,3-BDO. Por lo tanto, se proporciona un método para disminuir la relación entre etanol: 2,3-butanodiol, es decir, aumentar la concentración de 2,3-BDO producida por una fermentación microbiana de un sustrato de CO gaseoso al aumentar la concentración de al menos una de vitamina B1, vitamina B5 o vitamina B7, por encima de sus necesidades celulares. La concentración de vitamina B1, vitamina B5 y vitamina B7, puede modificarse individualmente o en cualquier combinación. Es decir, la vitamina B5 por sí sola puede aumentarse, la vitamina B1 por sí sola puede aumentarse, etc. De manera alternativa, la vitamina B5 y la vitamina B1 pueden aumentarse manteniendo constante la vitamina B7; la vitamina B7 y la vitamina B5 pueden aumentarse manteniendo constante la vitamina B1 o las vitaminas B1 y B7 pueden aumentarse manteniendo constante la vitamina B5. En otra realización más, las tres vitaminas B aumentan por encima de sus necesidades celulares.

En realizaciones particulares, la concentración de al menos uno de los nutrientes anteriores en el medio nutritivo líquido, aumenta por encima de las necesidades celulares de tal manera que el microorganismo produce 2,3-butanodiol a una velocidad de producción mayor de 10 g/l al día o mayor de 20 g/l al día.

Por ejemplo, el microorganismo es capaz de utilizar CO para producir etanol a una velocidad de producción mayor de 10 g/l al día o mayor de 15 g/l al día o mayor de 20 g/l al día o mayor de 30 g/l al día o mayor 40 g/l al día.

En realizaciones particulares del método, el proceso de fermentación es un proceso continuo. En una realización del

método, se utiliza un sistema de dos biorreactores para la producción de 2,3-butanodiol y etanol. En una realización, se utiliza un sistema de reactor múltiple.

La fermentación puede llevarse a cabo en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de células inmovilizadas, un reactor de elevación de gases, un reactor de columna de burbujas (BCR, *bubble column reactor*), un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueca (HFMBR, *Hollow Fibre Membrane Bioreactor*) o un reactor de lecho percolador (TBR). Además, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que se cultivan los microorganismos y un segundo reactor de fermentación, al que puede suministrarse caldo de fermentación desde el reactor de crecimiento y en el que se puede producir la mayor parte del producto de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato). El biorreactor de la presente invención está adaptado para recibir un sustrato gaseoso seleccionado del grupo que consiste en CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y mezclas de los mismos.

La bacteria carboxidotrófica acetogénica se selecciona de *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*. En diversas realizaciones, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

En realizaciones particulares, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum*. En una realización particular, 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) y que tiene el número de registro DSM10061 o DSM19630 o DSM 23693.

#### Fermentación

Como se indicó anteriormente, los ejemplos de bacterias que son adecuadas para su uso en la invención, incluyen las del género *Clostridium*, tales como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluyendo las descritas en los documentos WO 2000/68407, EP 117309, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.173.429, 5.593.886 y 6.368.819, y en los documentos WO 98/00558 y WO 02/08438, *Clostridium carboxidivorans* (Liou et al., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33: págs 2085-2091) y *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al., *Archives of Microbiology* 161: págs 345-351). Otras bacterias adecuadas incluyen las del género *Moorella*, incluyendo *Moorella* sp HUC22-1 (Sakai et al., *Biotechnology Letters* 29: págs. 1607-1612), y las del género *Carboxydotherrmus* (Svetlichny, V.A., et al. (1991), *Systematic and Applied Microbiology* 14: 254-260). Además, un experto en la materia puede utilizar otras bacterias anaerobias carboxidotróficas en los procesos. Al tener en cuenta la presente divulgación, también se apreciará que en los procesos de la presente invención, puede utilizarse un cultivo mixto de dos o más bacterias.

El cultivo de las bacterias que se utilizan en un método de la invención, puede realizarse utilizando cualquiera de los diversos procesos conocidos en la técnica para cultivar y fermentar sustratos utilizando bacterias anaerobias. En la sección de "Ejemplos" se proporcionan técnicas ejemplares. Como ejemplo adicional, pueden utilizarse los procesos descritos, en líneas generales, en los siguientes artículos, en los que se utilizan sustratos gaseosos para la fermentación: (i) K. T. Klasson, et al. (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. *Conservation and Recycling*, 5; 145-165; (ii) K. T. Klasson, et al. (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel*. 70. 605-614; (iii) K. T. Klasson, et al. (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. *Enzyme and Microbial Technology*. 14; 602-608; (iv) J. L. Vega, et al. (1989). Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. *Biotech. Bioeng.* 34. 6. 785-793; (vi) J. L. Vega, et al. (1989). Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Cultivo discontinuo. *Biotechnology and Bioengineering*. 34. 6. 774-784; (vii) J. L. Vega, et al. (1990). Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. *Resources, Conservation and Recycling*. 3. 149-160.

En una realización, el microorganismo se selecciona del grupo bacterias carboxidotróficas del orden *Clostridia*, que comprende las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*. En una realización adicional, el microorganismo es del grupo de bacterias carboxidotróficas del orden *Clostridia* que comprende las especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei* y aislados relacionados. Estos incluyen, pero sin limitación, las cepas de *C. autoethanogenum* JAI-1T (DSM10061) (Abrini, Naveau, Y Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO / 2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETCT (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, Y Yang, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (patente de Estados Unidos 5 593 886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (patente de Estados Unidos 6 368 819), *C. ljungdahlii* 0-52 (ATCC 55989) (patente de Estados Unidos 6 368 819), *C. Ragsdalei* P11T (ATCC BAA-622) (documento WO 2008/028055), aislados relacionados tales como "*C. coskatii*" (US20110229947) y "*Clostridium* sp." (Tyurin y Kiriukhin, 2012), o cepas mutadas tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. tesis doctoral, Universidad Estatal de

Carolina del Norte, 2010). Estas cepas forman un subgrupo dentro del grupo I de ARNr Clostridial, y su gen de ARNr 16S es más del 99 % idéntico con un bajo contenido similar de GC de alrededor del 30 %. Sin embargo, la reasociación de ADN-ADN y los experimentos de huella de ADN, mostraron que estas cepas pertenecían a especies distintas (documento WO 2008/028055).

5 Todas las especies del grupo mencionado anteriormente tienen una morfología y tamaño similares (el crecimiento logarítmico de las células varía de 0,5 a 0,7 x 3-5 mm), son mesófilas (temperatura óptima de crecimiento 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, tal 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). La producción de indol también se observó con las tres especies. Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización del sustrato de varios azúcares (por ejemplo, ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej. 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. Se ha descubierto que la organización y el número de genes de la ruta de Wood-Ljungdahl, responsables de la absorción de gas, es igual en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos (Köpke et al., 2011). 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 más bien rasgos generales del grupo de bacterias carboxidotróficas del orden *Clostridia* que sintetizan etanol y puede esperarse que el mecanismo funcione de manera similar en estas cepas, aunque puede haber diferencias en el rendimiento (Perez et al., 2012)

25 La fermentación puede llevarse a cabo en cualquier biorreactor adecuado. En algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que se cultivan los microorganismos, y un segundo reactor de fermentación, al que puede suministrarse caldo de fermentación desde el reactor de crecimiento y en el que se produce la mayor parte del producto de fermentación (por ejemplo, etanol y acetato).

30 *El sustrato que contiene CO*

En la reacción de fermentación de la invención, se usa un sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono. 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 determinadas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en la fabricación de productos de metales ferrosos, tal como se realiza en una acería, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinación de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbón, producción de amoniaco, producción de metanol y fabricación de coque. En estas realizaciones, el gas que contiene CO se captura del proceso industrial antes que se emita a la atmósfera, usando cualquier método conveniente.

45 En una realización específica, el sustrato que comprende CO procede del proceso de fabricación de acero. En el proceso de fabricación de acero, el mineral de hierro se tritura y pulveriza, se somete a pretratamientos, tales como sinterización o granulación, y después se transfiere a un alto horno (BF, *blast furnace*), donde se funde. En el proceso de fundición, el coque sirve como fuente de carbono, que funciona como agente reductor para reducir el mineral de hierro. El coque actúa como fuente de calor para calentar y fundir los materiales. El metal caliente se descarburiza en un horno básico de oxígeno (BOF, *basic oxygen furnace*) inyectando un chorro de oxígeno puro a alta velocidad contra la superficie del metal caliente. El oxígeno reacciona directamente con el carbono en el metal caliente para producir monóxido de carbono (CO). Por tanto, una corriente de gas con un alto contenido de CO se expulsa del BOF. De acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, esta corriente se utiliza para suministrarla a una o más reacciones de fermentación. Sin embargo, como sabrá un experto en la materia, el CO puede producirse en otro lugar dentro del proceso de fabricación de acero, y de acuerdo con diversas realizaciones de la invención, dichas fuentes alternativas pueden utilizarse en lugar de o en combinación con los gases de escape del BOF. Dependiendo de la fuente (es decir, la fase particular dentro del proceso de fabricación de acero), el contenido de CO de los gases expulsados puede variar. Además, puede haber períodos en los que haya interrupciones en una o más de dichas corrientes, particularmente en plantas de procesamiento discontinuo.

60 Generalmente, las corrientes expulsadas del proceso de descarburación de la acería, comprenden una alta concentración de CO y bajas concentraciones de H<sub>2</sub>. Aunque dichas corrientes pueden transferirse directamente al biorreactor con poco o ningún tratamiento adicional, puede ser deseable optimizar la composición de la corriente de sustrato para lograr una mayor eficiencia en la producción de alcohol y/o en la captura general de carbono. Por ejemplo, la concentración de H<sub>2</sub> en la corriente de sustrato puede aumentarse antes de que la corriente se transfiera al biorreactor.

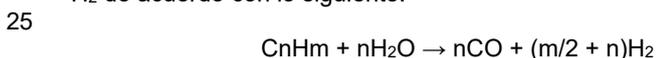
65 De acuerdo con realizaciones particulares de la invención, las corrientes de dos o más fuentes pueden combinarse y/o mezclarse para producir una corriente de sustrato deseable y/u optimizada. Por ejemplo, una corriente que

comprende una alta concentración de CO, tal como el gas de escape de un convertidor de acería, puede combinarse con una corriente que comprende altas concentraciones de H<sub>2</sub>, tal como el gas liberado de un horno de coque de una acería.

- 5 Una fase temprana del proceso de fabricación de acero normalmente implica la reducción de mineral de hierro utilizando coque. El coque es una fuente sólida de combustible de carbono que se utiliza para fundir y reducir el mineral de hierro y, normalmente, se produce *in situ* en una acería. En el proceso de fabricación de coque, el carbón bituminoso se suministra a una serie de hornos, que se sellan y calientan a altas temperaturas sin oxígeno, normalmente en ciclos que duran de 14 a 36 horas. El carbono sólido que queda en el horno es coque. Este se lleva a la torre de enfriamiento, donde se enfría con un aerosol acuoso o haciendo circular un gas inerte (nitrógeno), después se criba y se envía al alto horno.

15 Los compuestos volátiles producidos durante este proceso generalmente se procesan para eliminar el alquitrán, amoníaco, naftaleno, fenol, aceites ligeros y azufre antes de que el gas se utilice como combustible para calentar hornos. El gas producido como resultado de la producción de coque normalmente tiene un alto contenido de H<sub>2</sub> (composición habitual: 55 % de H<sub>2</sub>, 25 % de CH<sub>4</sub>, 6 % de CO, 3 % de N<sub>2</sub>, 2 % de otros hidrocarburos). Como tal, al menos una parte del gas del horno de coque puede desviarse al proceso de fermentación para mezclarlo con una corriente que comprende CO, para mejorar la productividad de alcohol y/o la captura general de carbono. Puede ser necesario tratar el gas del horno de coque antes de pasarlo al fermentador para eliminar los subproductos que pueden ser tóxicos para el cultivo.

En otras realizaciones, el sustrato que comprende CO puede proceder del reformado de hidrocarburos con vapor. Los hidrocarburos, tales como los hidrocarburos de gas natural pueden reformarse a alta temperatura para producir CO y H<sub>2</sub> de acuerdo con lo siguiente:



30 Como ejemplo, el reformado de metano con vapor implica hacer reaccionar el vapor con metano para producir CO y H<sub>2</sub> a temperatura elevada (700-1100° C) en presencia de un catalizador de níquel. La corriente resultante (que comprende 1 mol de CO y 3 moles de H<sub>2</sub> por cada mol de CH<sub>4</sub> convertido) puede transferirse directamente al fermentador o mezclarse con una corriente de sustrato de otra fuente para aumentar la productividad del etanol y/o la captura general de carbono en un proceso de fermentación. También pueden reformarse alcoholes, tal como metanol, para producir CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> que pueden utilizarse de manera similar.

35 En algunas realizaciones, el sustrato gaseoso que contiene CO puede proceder de la gasificación de materia orgánica tal como metano, etano, propano, carbón, gas natural, petróleo crudo, residuos de bajo valor de la refinería de petróleo (incluido el coque de petróleo o petcoke), desechos sólidos municipales o biomasa. La biomasa incluye subproductos obtenidos durante la extracción y procesamiento de productos alimenticios, tales como azúcar de la caña de azúcar o almidón del maíz o los granos, o los desechos no alimenticios de biomasa generados por la industria forestal. Cualquiera de estos materiales carbonosos puede gasificarse, es decir, quemarse parcialmente con oxígeno, para producir gas de síntesis (singas que comprende cantidades significativas de H<sub>2</sub> y compañía). Los procesos de gasificación normalmente producen un gas de síntesis con una relación molar de H<sub>2</sub> a CO de 0,4: 1 a 1,2: 1, junto con cantidades más bajas de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, metano y otras sustancias inertes. La relación del gas producido puede modificarse mediante medios conocidos en la técnica y se describen en detalle en el documento WO200701616. Sin embargo, como ejemplo, para ajustar la relación de producto CO:H<sub>2</sub>: composición de materia prima (en particular la relación C:H), pueden alterarse las siguientes condiciones del gasificador, presión de funcionamiento, perfil de temperatura (que influye en el enfriamiento de la mezcla de productos) y el oxidante empleado (aire, aire rico en oxígeno, O<sub>2</sub> puro o vapor; en donde el vapor tiende a producir relaciones de CO:H<sub>2</sub>) más altas). En consecuencia, las condiciones de funcionamiento del gasificador pueden ajustarse para proporcionar una corriente de sustrato con una composición deseable para la fermentación o mezclado con una o más corrientes distintas para proporcionar una composición optimizada o deseable para aumentar la productividad de alcohol y/o la captura general de carbono en un proceso de fermentación.

55 El reformado de gases o la gasificación de biomasa, por ejemplo, producción de singas, para producir corrientes que contienen CO, se describe en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US2013/0210096A1; US2013/0203143A1; US2013/0045517A1 y en la patente de Estados Unidos N.º 8 376 736.

60 Dependiendo de la composición del sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono, también puede ser deseable tratarlo para retirar cualquier impureza no deseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo en la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o lavarse utilizando métodos conocidos.

65 El sustrato que contiene CO normalmente contendrá una proporción importante de CO, tal como de al menos 15 % a 100 % de CO por volumen, de 15 % a 70 % de CO por volumen, de 40 % a 95 % de CO por volumen, de 40 % a 60 % de CO por volumen y de 45 % a 55 % de CO por volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende 25 % o 30 % o 35 % o 40 % o 45 % o 50 % de CO o 55 % de CO o 60 % de CO por volumen. También pueden ser apropiados sustratos que tengan concentraciones más bajas de CO, tal como 6 %, particularmente cuando también haya H<sub>2</sub> y

CO<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, el sustrato comprende un porcentaje de CO de 5 % a 70 %.

Independientemente de la fuente de la corriente gaseosa que comprende CO, generalmente contendrá diversos otros gases tal como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, etc. Por ejemplo, puede haber CO<sub>2</sub> en una concentración de 1 % a 80 % por volumen o de 1 % al 30 % por volumen o de 5 % a 30 %. En una realización general, el sustrato que se transfiere al biorreactor normalmente tendrá concentraciones de 20 a 80 % de CO, de 0 a 30 % de H<sub>2</sub> y de 0 a 40 % de CO<sub>2</sub>.

Generalmente, el dióxido de carbono se añadirá a la reacción de fermentación en estado gaseoso. Sin embargo, la divulgación 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 contenga monóxido de carbono y después ese líquido puede añadirse a un biorreactor. Esto puede realizarse utilizando metodología estándar. Como ejemplo, podría utilizarse 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).

Además, a menudo es deseable aumentar la concentración de CO de una corriente de sustrato (o presión parcial de CO en un sustrato gaseoso) y así 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 utilizadas 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 O<sub>2</sub> puede reducir la eficiencia de un proceso de fermentación anaerobia. 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, se puede usar 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 eliminar componentes no deseados y aumentar la concentración de componentes deseables.

La eliminación de componentes gaseosos no deseados de la corriente de sustrato se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales tales como fraccionamiento criogénico, tamizado molecular, adsorción, adsorción por oscilación de presión, o absorción. Cualquiera que sea el proceso utilizado, la separación de gases puede realizarse para aislar al menos una parte de uno o más de los siguientes componentes: H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y CO, de la corriente de gas. De manera adicional o alternativa, la separación de gases según las realizaciones de la invención, puede utilizarse para eliminar una o más partes de la corriente de gas (por ejemplo, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) para que el resto se pueda utilizar de manera más eficiente, tal como en el biorreactor.

La adsorción es la acumulación de gases, líquidos o solutos en la superficie de un sólido o líquido. La absorción es el proceso por el cual una sustancia, tal como un sólido o líquido, toma otra sustancia, tal como un líquido o gas, a través de diminutos poros o espacios entre sus moléculas.

La adsorción por oscilación de presión (PSA, *pressure swing adsorption*) es un proceso adiabático que puede utilizarse en la purificación de gases para eliminar las impurezas que lo acompañan por adsorción a través de adsorbentes adecuados en lechos fijos contenidos en recipientes de presión a alta presión. La regeneración de los adsorbentes se logra mediante la despresurización a contracorriente y mediante la purga a baja presión con gas de calidad cercana al producto previamente recuperado. Para obtener un flujo continuo de producto, preferiblemente se proporcionan al menos dos adsorbentes, de manera que al menos un adsorbente reciba una corriente de gas (tal como una corriente de gas de desecho/escape/biogás) y realmente produzca un producto de la pureza deseada. De manera simultánea, las etapas posteriores de despresurización, purga y represurización de vuelta a la presión de adsorción, son ejecutadas por el (los) otro(s) adsorbente(s). Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente adsorbentes comunes dependiendo del tipo de impureza que se adsorberá y eliminará. Los adsorbentes adecuados incluyen tamices moleculares zeolíticos, carbono activado, gel de sílice o alúmina activada. Se pueden utilizar combinaciones de lechos adsorbentes uno encima del otro, dividiendo así el contenido del adsorbente en varias zonas distintas. La adsorción por oscilación de presión implica una oscilación pendular en parámetros tales como presión, temperatura, flujo y composición de fase gaseosa y adsorbida.

La purificación o separación de gases utilizando PSA normalmente tiene lugar a temperaturas de gas de suministro cercanas a la ambiente, por lo que los componentes a eliminar se adsorben selectivamente. Idealmente, la adsorción debería ser suficientemente reversible como para permitir la regeneración de adsorbentes a temperatura ambiente similar. La PSA puede utilizarse para el tratamiento y/o purificación de gases más comunes, incluido CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Ejemplos de técnicas de adsorción por oscilación de presión se describen en detalle en Ruthven, Douglas M. et al., 1993 Pressure Swing Adsorption, John Wiley and Sons.

Un tamiz molecular es un material que contiene poros diminutos de un tamaño exacto y uniforme que se utiliza como adsorbente para gases y líquidos. Las moléculas que son lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de los poros se adsorben, mientras que las moléculas más grandes no. Un tamiz molecular es similar a un filtro corriente pero funciona a nivel molecular. Los tamices moleculares a menudo consisten en minerales de aluminosilicato, arcillas, cristales porosos, carbones vegetales microporosos, zeolitas, carbones activos, o compuestos sintéticos que tienen

estructuras abiertas a través de las cuales, pequeñas moléculas, tales como nitrógeno y agua, pueden difundirse. Los métodos para la regeneración de tamices moleculares incluyen cambio de presión (por ejemplo, en concentradores de oxígeno) y calentamiento y purga con un gas portador.

- 5 Se pueden usar membranas, por ejemplo, para separar hidrógeno de gases como nitrógeno y metano, para recuperar hidrógeno, para separar metano de biogás, o para eliminar vapor de agua, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S o líquidos orgánicos volátiles. Al tener en cuenta la presente divulgación, se pueden seleccionar diferentes membranas, incluidas las membranas porosas y no porosas, para que sirvan al propósito deseado, como sería evidente para un experto en la materia. Por ejemplo, una membrana de paladio permite el transporte de H<sub>2</sub> únicamente. En una realización particular, el CO<sub>2</sub> puede separarse de una corriente, utilizando una membrana permeable a CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> separado de la corriente puede transferirse a un eliminador de CO<sub>2</sub> tal como el gasificador comentado anteriormente.

- 15 El fraccionamiento criogénico implica comprimir la corriente de gas y enfriarla a una temperatura lo suficientemente baja como para permitir la separación por destilación. Puede utilizarse, por ejemplo, para eliminar CO<sub>2</sub>. Antes de realizar el fraccionamiento criogénico, normalmente determinados componentes (por ejemplo, agua) se eliminan de la corriente.

- 20 También pueden utilizarse las mismas técnicas para eliminar el oxígeno de una corriente gaseosa para producir corrientes anaerobias ricas en CO y/o CO<sub>2</sub>. Además, el oxígeno puede eliminarse biológicamente, por ejemplo, haciendo pasar el gas de escape de combustión a un fermentador sellado que contenga microorganismos aerobios facultativos, un sustrato de carbono reducido y los nutrientes necesarios para los microorganismos. Los microorganismos aerobios facultativos pueden consumir oxígeno para crear corrientes anaerobias ricas en CO y/o CO<sub>2</sub>.

- 25 En la técnica también se conocen métodos alternativos para separar o eliminar O<sub>2</sub> de una corriente gaseosa. Sin embargo, como ejemplo, el oxígeno puede reducirse y/o eliminarse simplemente utilizando cobre caliente o un convertidor catalítico.

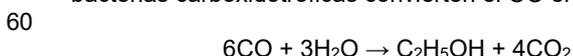
- 30 Adaptar el proceso de separación de gases a una fuente particular de gas, puede hacer que un proceso de bioconversión, que de otra manera no sería comercialmente viable, sea comercialmente viable. Por ejemplo, con separación adecuada de CO de una corriente de escape de un automóvil, se puede obtener una fuente de energía utilizable de la corriente y se pueden reducir las emisiones de gases no deseadas. De acuerdo con una realización de la invención, el sustrato gaseoso comprende Singas que contiene CO y H<sub>2</sub>, y la separación de gases se realiza para eliminar el hidrógeno de la corriente para que pueda aislarse y utilizarse como combustible fuera del proceso de fermentación. El CO puede utilizarse para suministrarse a la reacción de fermentación.

- 35 El pH del caldo de fermentación utilizado en el proceso de fermentación puede ajustarse según sea necesario. El pH apropiado dependerá de las condiciones requeridas para una reacción de fermentación particular teniendo en cuenta los medios nutritivos y los microorganismos utilizados, como apreciarán los expertos habituales en la materia a la que se refiere la invención. En una realización preferida, en la fermentación de un sustrato gaseoso que contiene *Clostridium autoethanogenum* que utiliza CO, el pH puede ajustarse de aproximadamente 4,5 a 6,5. Otros ejemplos incluyen un pH de 5,5 a 6,5 utilizando *Moorella thermoacetica* para la producción de ácido acético, un pH de 4,5 a 6,5 utilizando *Clostridium acetobutylicum* para la producción de butanol y un pH de 7 utilizando *Carboxydotherrmus hygrogeniformans* para la producción de hidrógeno. Los expertos en la materia conocerán los medios adecuados para mantener el biorreactor al pH requerido. Sin embargo, como ejemplo, para aumentar y disminuir el pH del medio de fermentación y mantener el pH deseado, pueden utilizarse bases acuosas, tales como NaOH, y ácidos acuosos, tales como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

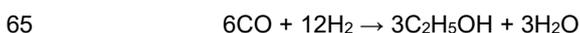
- 50 Un beneficio adicional de la invención es que, dado que no hay, o solo hay un mínimo de depuración y/u otros procesos de tratamiento de los gases residuales, antes de su uso en una reacción de fermentación, los gases contendrán material adicional resultante del proceso industrial, cuyo material adicional puede usarse, al menos en parte, como materia prima para la reacción de fermentación.

#### Mezcla de corrientes

- 55 Puede ser deseable mezclar una corriente de sustrato reformado que comprenda CO y H<sub>2</sub> 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 ligados a teoría alguna, en algunas realizaciones de la presente invención, las bacterias carboxidotróficas convierten el CO en etanol de acuerdo con la siguiente ecuación:



Sin embargo, en presencia de H<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub> para aumentar la relación de CO:H<sub>2</sub> para optimizar la eficiencia de la fermentación. Como ejemplo, corrientes de residuos industriales, tales como los gases liberados de una acería, tienen un alto contenido de CO, pero incluyen una cantidad mínima de H<sub>2</sub> o ninguna. Como tal, puede ser deseable mezclar una o más corrientes que comprendan CO y H<sub>2</sub> con la corriente residual que comprende CO, antes de proporcionar la corriente de sustrato mezclada al fermentador. La eficacia general, productividad de alcohol y/o captura general de carbono de la fermentación, dependerán de la estequiometría del CO y H<sub>2</sub> en la corriente mezclada. Sin embargo, en realizaciones particulares, la corriente mezclada puede comprender sustancialmente CO y H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> en relaciones particulares a diferentes fases de la fermentación. Por ejemplo, pueden proporcionarse corrientes de sustrato con un contenido relativamente alto de H<sub>2</sub> (tal como 1:2 CO:H<sub>2</sub>) 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 modo 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 H<sub>2</sub> puede ser mayor o igual a cero).

La combinación de corrientes también puede tener otras ventajas, particularmente en los casos en los que una corriente de desechos que comprende CO es de naturaleza intermitente. Por ejemplo, una corriente de desechos intermitente que comprende CO puede mezclarse con una corriente de sustrato reformada sustancialmente continua que comprende CO y H<sub>2</sub> y proporcionarse al fermentador. En realizaciones particulares de la invención, la composición y el caudal de la corriente mezclada 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 utilizado. Únicamente como ejemplo, medios anaerobios adecuados para el crecimiento de *Clostridium autoethanogenum* conocidos en la técnica, se describen, por ejemplo, en Abrini et al (*Clostridium autoethanogenum*, sp. Nov., An Anaerobic Bacterium That Produces Ethanol From Carbon Monoxide; Arch. Microbiol., 161: 345-351 (1994)). Más adelante en la sección de "Ejemplos" del presente documento proporciona ejemplos adicionales de medios adecuados.

#### *El biorreactor*

La fermentación puede llevarse a cabo en cualquier biorreactor adecuado, tal como un reactor de células inmovilizadas, un reactor de elevación de gases, un reactor de columna de burbujas (BCR, *bubble column reactor*), un reactor de membrana, tal como un biorreactor de membrana de fibra hueca (HFM BR) o un reactor de lecho percolador (TBR). Además, en algunas realizaciones de la invención, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento en el que se cultivan los microorganismos y un segundo reactor de fermentación, al que puede suministrarse caldo de fermentación desde el reactor de crecimiento y en el que se puede producir 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 contenga CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y opcionalmente CO.

#### *Condiciones de fermentación*

Se conocen procesos para la producción de etanol y otros alcoholes a partir de sustratos gaseosos. Los procesos ejemplares incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/064200, US 6 340 581, US 6 136 577, US 5 593 886, US 5 807 722 y US 5 821 111.

De manera deseable, la fermentación debe realizarse 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, presión, caudal de los medios, pH, potencial redox de los medios, velocidad de agitación (en caso de utilizar un reactor de tanque agitado de flujo continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato y tasas 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 utilizado. 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.

Además, 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 Estados Unidos 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 solo necesitan ser 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 200 kPag (29 psig) y 520 kPag (75 psig), dando productividades de etanol de 150 g/l/día y 369 g/l/día, respectivamente. Sin embargo, se descubrió que las fermentaciones de ejemplo realizadas utilizando medios similares y composiciones de gases de entrada a presión atmosférica producían entre 10 y 20 veces menos etanol por litro al día. Por lo tanto, El proceso de fermentación se puede llevar a cabo desde presión atmosférica (0 kPag) hasta 600 kPag.

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

#### *Productos de fermentación*

Tanto los productos derivados de piruvato como los productos derivados de acetil coA, pueden utilizarse tal como se producen o pueden utilizarse en la producción de otros productos químicos tales como la producción de plásticos, productos farmacéuticos y agroquímicos. Por ejemplo, el producto de fermentación se utiliza para producir hidrocarburos de la gama de gasolina (8 carbonos), hidrocarburos diésel (12 carbonos) o hidrocarburos de combustible para aviones (12 carbonos). El etanol y el acetato pueden reaccionar para producir conjuntamente productos químicos, incluidos ésteres. Por ejemplo, para producir acetato de etilo, se hace que el etanol y el acetato producidos mediante fermentación, reaccionen conjuntamente. El acetato de etilo puede ser valioso para muchos otros procesos, tales como la producción de disolventes, incluidos los revestimientos de superficies y diluyentes, así como en la fabricación de productos farmacéuticos, saborizantes y esencias.

En el caso del 2,3-BDO, éste puede convertirse en un dímero de ocho carbonos que puede utilizarse como combustible de aviación. El 2,3-BDO también puede convertirse en un compuesto seleccionado del grupo que consiste en buteno(s), butadieno, metil etil cetona (MEK) y mezclas de los mismos. La conversión de 2,3-BDO en diversos compuestos químicos se describe en la patente de los Estados Unidos N° 8.658.408.

Además, se desvela, que al menos una parte de un producto hidrocarbonado producido mediante fermentación, se reutiliza en el proceso de reformado con vapor. Esto puede realizarse porque aparte del CH<sub>4</sub> los hidrocarburos pueden reaccionar con vapor sobre un catalizador para producir H<sub>2</sub> y CO. Por ejemplo, el etanol se recicla para utilizarse como materia prima para el proceso de reformado con vapor. En otro ejemplo, la materia prima y/o producto hidrocarbonado se hace pasar a través de un prerreformador antes de utilizarse 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.

#### *Recuperación de los productos*

Los productos de la reacción de fermentación pueden recuperarse utilizando métodos conocidos. Los métodos ejemplares incluyen los descritos en los documentos WO07/117157, WO08/115080, US 6 340 581, US 6 136 577, US 5 593 886, US 5 807 722 y US 5 821 111. Sin embargo, brevemente y como ejemplo, el etanol puede recuperarse del caldo de fermentación mediante métodos tales como destilación fraccionada o evaporación, y fermentación extractiva.

La destilación de etanol de un caldo de fermentación produce una mezcla azeotrópica de etanol y agua (es decir, 95 % de etanol y 5 % de agua). El etanol anhidro puede obtenerse posteriormente utilizando tecnología de deshidratación de etanol con tamices moleculares, muy conocidos 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 utilizarse en este tipo de proceso de extracción. El alcohol oleílico se introduce continuamente en un fermentador, después de lo cual, este disolvente se eleva formando una capa en la parte superior del fermentador que se extrae continuamente y se suministra a través de una centrifugadora. Después, 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 condensa, mientras que el alcohol oleílico no es volátil y se recupera para su reutilización en la fermentación.

**Tabla 1: Medios de fermentación**

Medios		
Componente	Concentración (mM/l)	
MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	2	
NaCl	2	
CaCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	2	
KCl	25	
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85 %	0,375 ml	
Oligoelementos metálicos	7,5 ml	
Vitaminas B	20 ml	
Composición de oligoelementos metálicos	Concentración final en los medios (mmol/l)	Concentración (mM/l) 200 x solución madre
FeCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	150	20
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	7,5	1
ZnCl <sub>2</sub>	7,5	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	0,4
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	3	0,4
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	3	0,4
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	3	0,4
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	3	0,4
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	3	0,4
Vitamina	Concentración final en los medios (mg/l)	Concentración (mg/l) 100 x solución madre
Clorhidrato de tiamina (B1)	1	50
Riboflavina (B2)	1	50
Ácido nicotínico (B3)	1	50
Ácido pantoténico (B5)	1	50
Clorhidrato de piridoxina (B6)	0,2	10
Biotina (B7)	0,4	20
Ácido fólico (B9)	0,2	10
Ácido 4-aminobenzoico (PABA o B10)	1	50
Cianocobalamina (B12)	1	50
Ácido lipoico (ácido tiótico)	1	50

5

**Ejemplo 1 - Efecto de aumentar la concentración de vitamina B5 sobre la producción de 2,3-BDO**

Este experimento se realizó de acuerdo con el proceso de fermentación general descrito anteriormente. Durante el transcurso del experimento de fermentación, el flujo de gases y la agitación se aumentaron para minimizar la producción de acetato y maximizar la de etanol. La tasa de dilución y la tasa de dilución bacteriana se ajustaron de manera que el día 5,0 estas fueran de 1,8 día<sup>-1</sup> y de 0,85 día<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores se mantuvieron durante el resto de la fermentación. Entre el día 6,0 y el día 8,0, se obtuvieron datos estables con la tasa de suministro de B5 de 198 mg/g producidos por las células. Los resultados obtenidos durante este período estable se resumen en **Tabla 2**.

15

**Tabla 2: Resultados de fermentación con 198 mg/g de vitamina B5 producidos por las células**

Medida	Concentración
Biomasa	10,62 g/l
Absorción de CO	8,4 mol/l/día
Etanol	18,69 g/l
Acetato	7,75 g/l
2,3-BDO	4,8 g/l
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	0,81 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	3,17 g de etanol/g de biomasa/día
Relación de Etanol: 2,3-BDO	3,8:1

El día 8,1, la concentración de vitamina B5 en los medios aumento 10 veces y los restantes parámetros operativos permanecieron iguales. Durante este tiempo, la tasa de producción de biomasa disminuyó ligeramente por lo que, en consecuencia, la tasa de suministro de vitamina B5 aumentó en poco más de diez veces a 2 180 mg/g producidos por las células. Después del aumento en la concentración de vitamina B5, la tasa de producción y la concentración específica de 2,3-BDO aumentaron, permaneciendo estables los restantes parámetros. Los resultados se resumen a continuación en **Tabla 3**.

**Tabla 3: Resultados de fermentación con 2 180 mg/g de vitamina B5 producidos por las células**

Medida	Concentración
Biomasa	10,4 g/l
Absorción de CO	8,0 mol/l/día
Etanol	19,49 g/l
2,3-BDO	7,0 g/l
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	1,32 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	3,3 g de etanol/g de biomasa/día
Relación de Etanol: 2,3-BDO	2,6:1

Este es un resultado sorprendente, ya que solo aumenta la tasa de producción específica de 2,3-BDO y la concentración de 2,3-BDO, mientras que la tasa de producción de otros metabolitos, por ejemplo, etanol y biomasa, sigue siendo la misma.

#### 15 Ejemplo 2-

*Efecto del aumento de vitamina B5 desde el inicio de la fermentación sobre la producción de 2,3-BDO*

El ejemplo anterior puede compararse con los resultados cuando hay un exceso de vitamina B5 en los medios de fermentación durante toda la fermentación. Durante este experimento de fermentación, se aumentaron los gases y la agitación para minimizar la producción de acetato y maximizar la de etanol. La tasa de dilución y la tasa de dilución bacteriana se ajustaron por día de 4,0 a 1,7 día<sup>-1</sup> y 0,65 día<sup>-1</sup>, respectivamente. En este caso, la concentración de 2,3-BDO alcanzó los 9 g/l con una relación de etanol: 2,3-BDO de 2: 1 (**Figura 2**), y una absorción de CO de 9,4 mol/l/día (**Figura 3**). La tasa de suministro de vitamina B5 durante toda la fermentación fue > de 2 000 mg/g producidos por las células. Durante el día 6,0 a 7,0, como la producción de biomasa y 2,3-BDO se estabilizó, la tasa de suministro de vitamina B5 fue de 2 011 mg/g producidos por las células. La tasa de producción específica de 2,3-BDO fue de 1,2 g/día por g de biomasa, la tasa de producción específica de etanol fue de 2,4 g/día por g de biomasa.

#### 30 Ejemplo 3-

*Efecto del aumento/disminución de la concentración de vitamina B1 sobre la producción de 2,3-BDO*

Se inició una fermentación utilizando el proceso de fermentación general aumentando los gases y la agitación para minimizar la producción de acetato y maximizar la de etanol. La tasa de dilución y la tasa de dilución bacteriana se ajustaron por día de 4,0 a 2,0 día<sup>-1</sup> y 1,2 día<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores se mantuvieron durante el resto de la fermentación. Entre el día 10,0 y el día 14,0 se obtuvieron datos estables, la tasa de suministro de B1 durante este tiempo fue de 303 mg/g producidos por las células. Los datos obtenidos se resumen en **Tabla 4**.

**Tabla 4: Resultados del exceso de vitamina B1 (303 mg/g producidos por las células)**

Medida	Concentración
relación de Etanol: 2,3BDO	4,7:1
2,3-BDO	3,4 g/l
Biomasa	5,79 g/l
Etanol	16,05 g/l
Absorción de CO	8,0 mol/l/día
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	1,17 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	5,54 g de etanol/g de biomasa/día

El día 14,1, la concentración de B1 en los medios disminuyó para reducir la tasa de suministro de B1 específica, manteniéndose constantes los restantes parámetros operativos. Entre el día 14,1 al 22,0 hubo una disminución en la producción de 2,3-BDO y la relación de etanol:2,3-BDO aumentó de 4,7:1 a 12:1. Durante este tiempo, la tasa de suministro de B1 específica disminuyó de 303 mg/g producidos por las células a 61 mg/g producidos por las células. Los resultados se resumen en la **Tabla 5**.

**Tabla 5: Resultados de la disminución de vitamina B1 (61 mg/g producidos por las células)**

Medida	Concentración
Etanol: 2,3-BDO	12:1
Título de 2,3-BDO	1,6 g/l
Biomasa	6,75 g/l
Etanol	18,23 g/l
Absorción de CO	8,0 mol/l/día
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	0,47 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	5,4 g de etanol/g de biomasa/día

Este es un resultado sorprendente, porque al disminuir la concentración de B1 disminuye la producción de 2,3-BDO, mientras que la producción de etanol no se vio afectada y la absorción de CO se mantuvo constante. Se ha informado en la técnica, que la concentración limitante de B1 para el crecimiento y la producción de acetato es de 6,5 mg/g producidos por las células. Por lo tanto, suministrar B1 muy por encima de las necesidades mínimas para el crecimiento celular proporciona una manera de controlar la producción de 2,3-BDO y la relación de etanol: 2,3-BDO.

**Ejemplo 4: Efecto de aumentar la concentración de B7 sobre la producción de 2,3-BDO**

En este ejemplo, se analizó el impacto de B7 sobre la producción de 2,3-BDO utilizando un crecimiento de fermentación de acuerdo con el proceso de fermentación general. Durante el transcurso de la fermentación, los gases y la agitación se aumentaron para minimizar la producción de acetato y maximizar la de etanol. La tasa de dilución y la tasa de dilución bacteriana se ajustaron de manera que el día 8,0 estas fueran de 1,8 día<sup>-1</sup> y de 0,75 día<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores se mantuvieron durante el resto de la fermentación. Se obtuvieron datos estables con la tasa de suministro de B7 a 90 mg/g producidos por las células. Los resultados obtenidos en ese momento se resumen a continuación;

**Tabla 6: Resultados de fermentación con 90 mg/g de vitamina B7 producidos por las células**

Medida	Concentración
Biomasa	9,42 g/l
Absorción de CO	8,0 mol/l/día
Etanol	15,63 g/l
Acetato	8,13 g/l
2,3-BDO	4,94 g/l
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	1,19 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	3,78 g de etanol/g de biomasa/día
Etanol: relación de 2,3-BDO	3,2:1

El día 8,69, la concentración de B7 en los medios aumentó 10 veces, manteniéndose constantes los restantes parámetros operativos. Durante este tiempo, la tasa de producción de biomasa se mantuvo estable, por lo que la tasa de suministro de B7 aumentó sobre diez veces a 980 mg/g producidos por las células. Después del aumento del suministro de B7, la tasa de producción específica de 2,3-BDO y la concentración de 2,3-BDO aumentaron. Los datos obtenidos de los días 13-14 se resumen a continuación;

**Tabla 7: Resultados de fermentación con 980 mg/g de vitamina B7 producidos por las células**

Medida	Concentración
Biomasa	9,23 g/l
Absorción de CO	7,6 mol/l/día
Etanol	14,92 g/l
2,3-BDO	7,34 g/l
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	1,97 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	3,85 g de etanol/g de biomasa/día
Etanol: relación de 2,3-BDO	1,91:1

A medida que la concentración de 2,3-BDO alcanzaba un pico (día 14,04), el suministro de B7 en los medios se reducía 10 veces, de modo que la tasa de suministro de B7 específica se reducía de nuevo a 90 mg/g producidos por las células. Se observó que los datos de las variables medidas se acercaban mucho a los valores observados antes del aumento de la concentración de B7 y se resumen a continuación.

**Tabla 8: Resultados de fermentación cuando la concentración de vitamina B7 se redujo a 90 mg/g producidos por las células**

Medida	Concentración
Biomasa	10,53 g/l
Absorción de CO	7,6 mol/l/día

Medida	Concentración
Etanol	15,70 g/l
2,3-BDO	4,76 g/l
Tasa de producción específica de 2,3-BDO	1,1 g de 2,3-BDO/g de biomasa/día
Tasa de producción específica de etanol	3,59 g de etanol/g de biomasa/día
Etanol: relación de 2,3-BDO	3,3:1

5 Este es un resultado sorprendente, ya que es la tasa de producción específica de 2,3-BDO y la concentración de 2,3-BDO lo que aumenta en lugar de cualquier otro metabolito y o biomasa. Los resultados también muestran que el impacto del aumento de B7 es reversible y que el aumento de B7 no produce ningún impacto sobre la tasa de producción específica de etanol. Los resultados de los cambios en la concentración de B7 se presentan en **Figuras 4 y 5**.

10 En el presente documento se ha descrito la invención con referencia a determinadas realizaciones preferidas, para permitir al lector llevar a la práctica la invención sin excesiva experimentación.

Más particularmente, como apreciará un experto en la materia, las implementaciones de las realizaciones de la invención, pueden incluir uno o más elementos adicionales. Solo los elementos necesarios para comprender la invención en sus diversos aspectos, pueden haberse mostrado en un ejemplo particular o en la descripción.

15 A lo largo de esta memoria descriptiva y de cualquiera de las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, deben interpretarse en un sentido inclusivo en lugar de exclusivo, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero sin limitación".

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la producción de al menos un producto derivado de piruvato durante la fermentación microbiana, comprendiendo el método:

- 5 a) proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO<sub>2</sub> a un biorreactor que comprende un cultivo de al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico en un medio nutritivo líquido, para producir al menos un producto derivado de piruvato y al menos un producto derivado de acetil-CoA; y
- 10 b) aumentar la concentración de al menos un nutriente en el medio nutritivo líquido, a una concentración por encima de las necesidades celulares del al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico, de manera que aumente la producción de al menos un producto derivado de piruvato, seleccionándose dicho nutriente del grupo que consiste en:

- 15 1) vitamina B1;  
2) vitamina B5;  
3) vitamina B7 y mezclas de las mismas;

y en donde

- 20 (a) la concentración de vitamina B1 en el medio nutritivo líquido varía de 20 a 500 mg/g de biomasa producida;  
o  
(b) la concentración de vitamina B5 en el medio nutritivo líquido varía de 100 a 4 000 mg/g de biomasa producida; o  
25 (c) la concentración de vitamina B7 en el medio nutritivo líquido varía de 100 a 4 000 mg/g de biomasa producida.

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.

30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración de vitamina B5 o vitamina B1 aumenta de 2 a 80 veces por encima de las necesidades celulares del al menos un microorganismo.

4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración de vitamina B7 aumenta en el medio nutritivo líquido de 2 a 30 veces por encima de las necesidades celulares del al menos un microorganismo.

35 5. El método de la reivindicación 1, en donde el producto derivado de piruvato se selecciona del grupo que consiste en 2,3-butanodiol, lactato, succinato, metil etil cetona, 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, acetofina, isobutanol, citramalato, butadieno y ácido poliláctico.

40 6. El método de la reivindicación 1, en donde el producto derivado de acetil-CoA se selecciona del grupo que consiste en etanol, acetato, acetona, butanol, isobutileno, 3-hidroxipropionato y ácidos grasos.

7. El método de la reivindicación 2, en donde la producción de 2,3-butanodiol aumenta de tal manera que la relación de etanol: 2,3-butanodiol varía de 4: 1 a 1: 1.

45 8. El método de la reivindicación 2, en donde la producción de 2,3-butanodiol es de al menos 10 g/l al día.

9. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el microorganismo carboxidotrófico acetogénico se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* o *Butyribacterium*.

50 10. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el microorganismo carboxidotrófico acetogénico se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahli*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

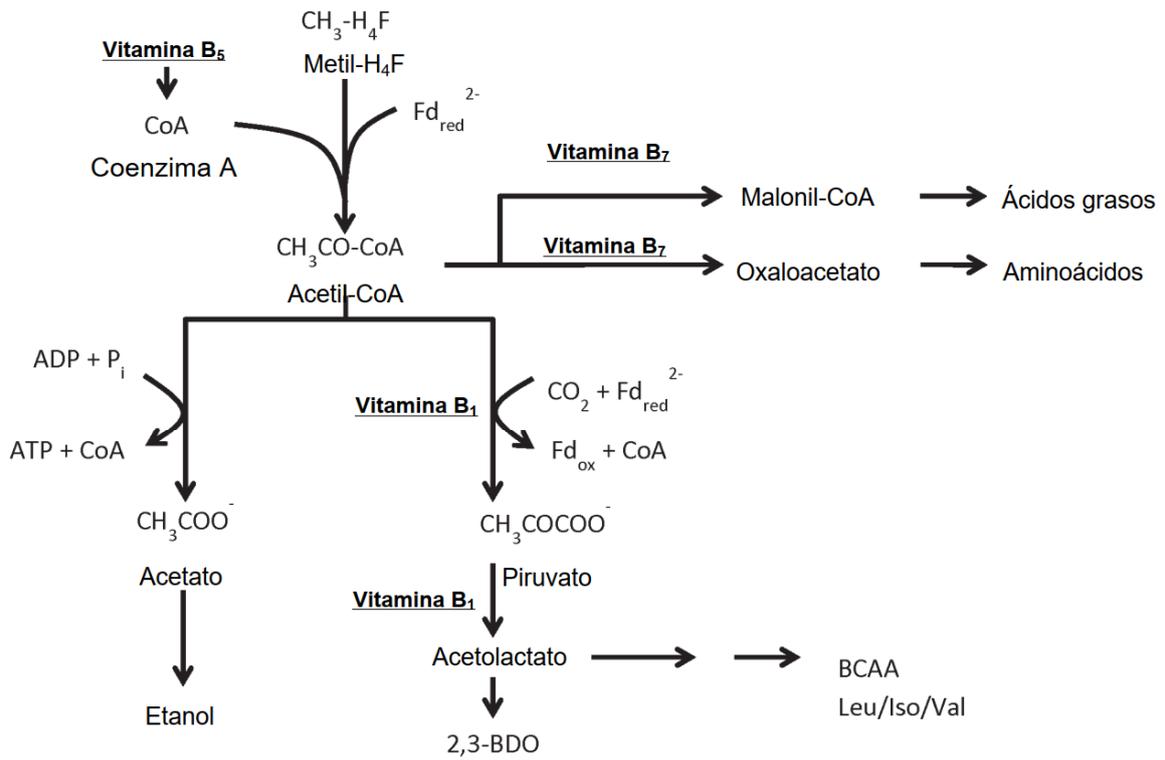


FIG. 1

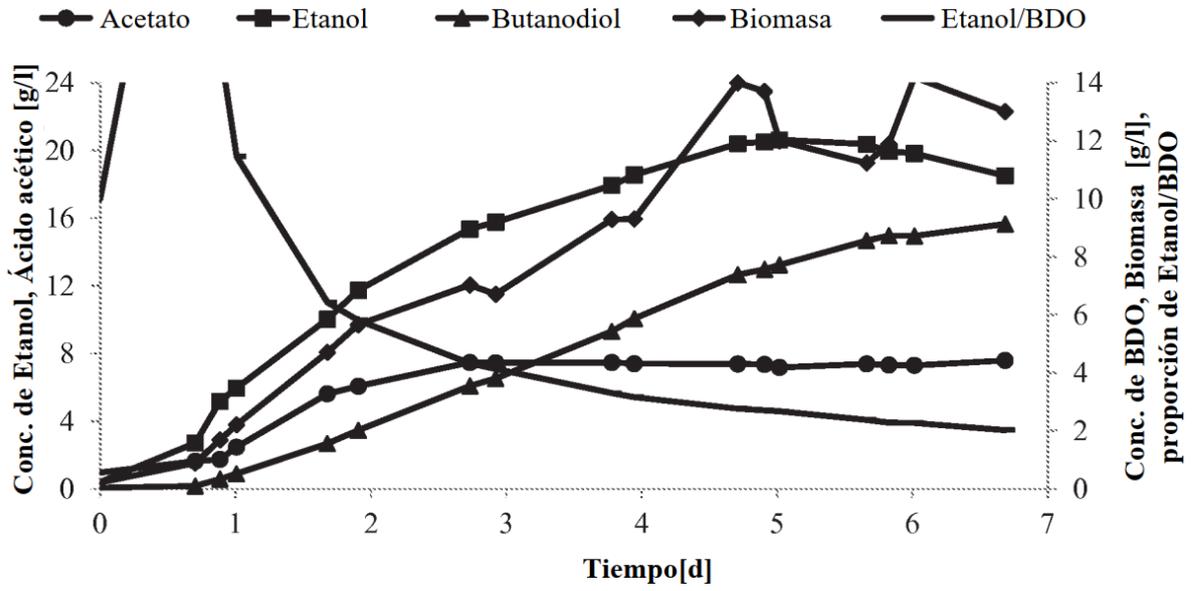


FIG. 2

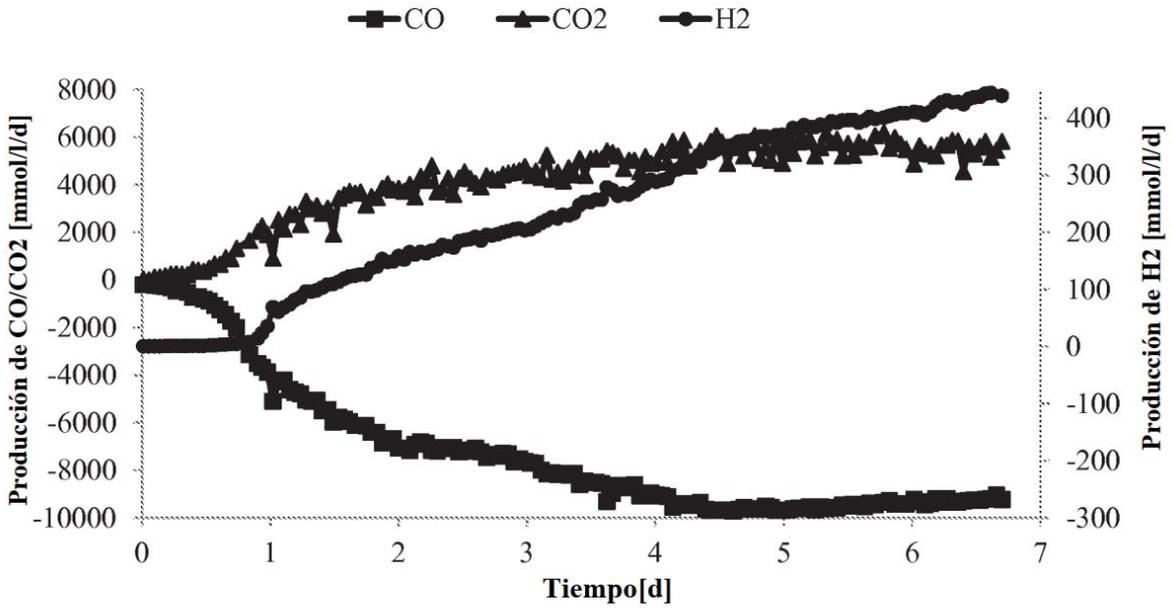


FIG. 3

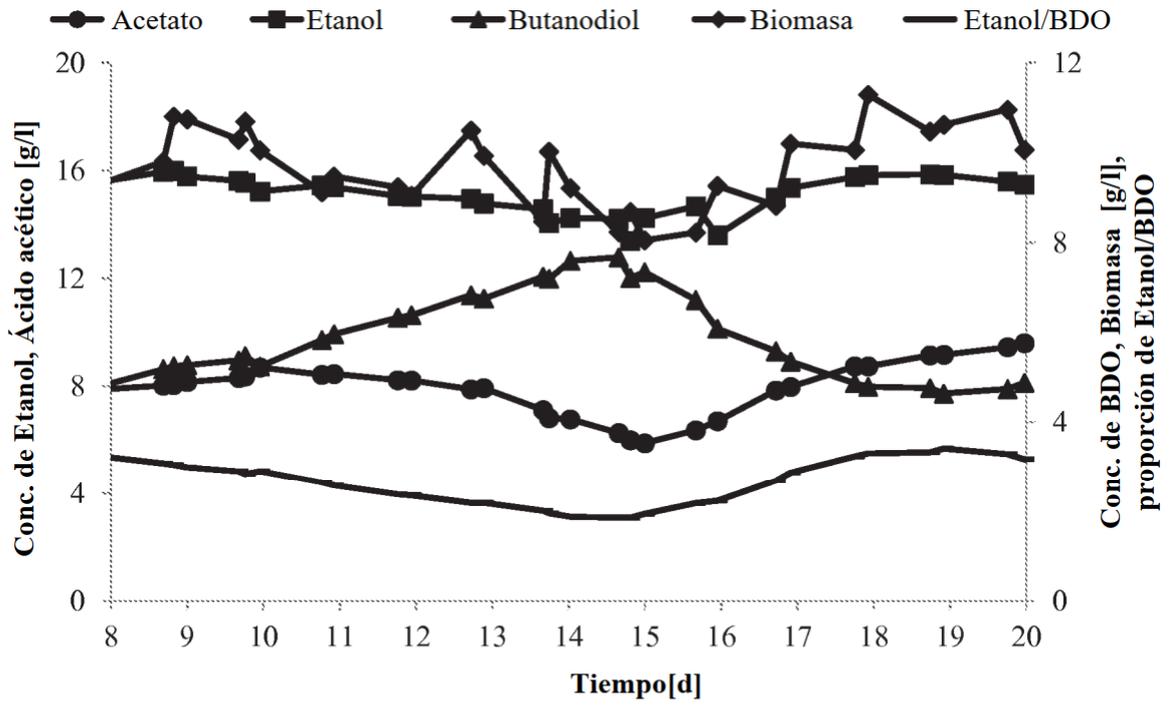


FIG. 4

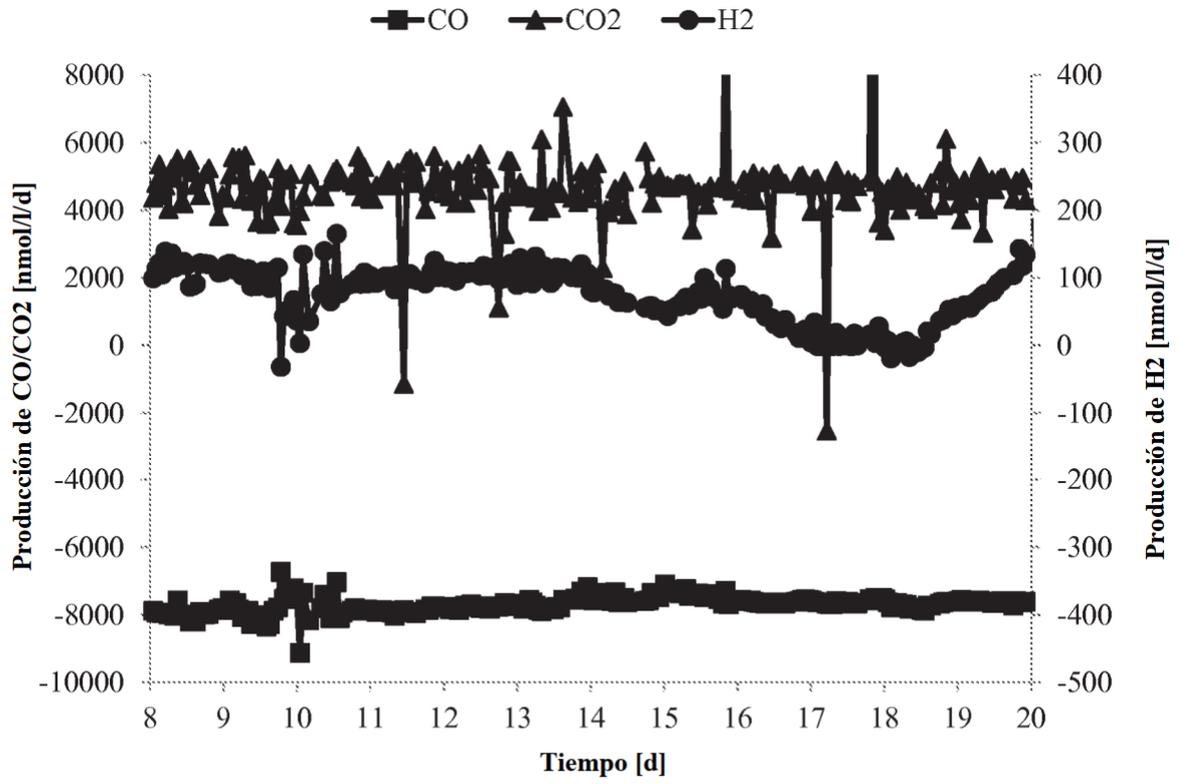


FIG. 5