



CSA126657



PGT

Organización y
Digitalización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

10-77725

21. EXPEDIENTE Nº _____

54. TÍTULO RECUPERACIÓN DE ALCOHOLES SUPERIORES A

PARTIR DE SOLUCIONES ACUOSAS DILUIDAS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL B01D 3/10

71. SOLICITANTE GEVO, INC.

DOMICILIO Englewood, Colorado, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____

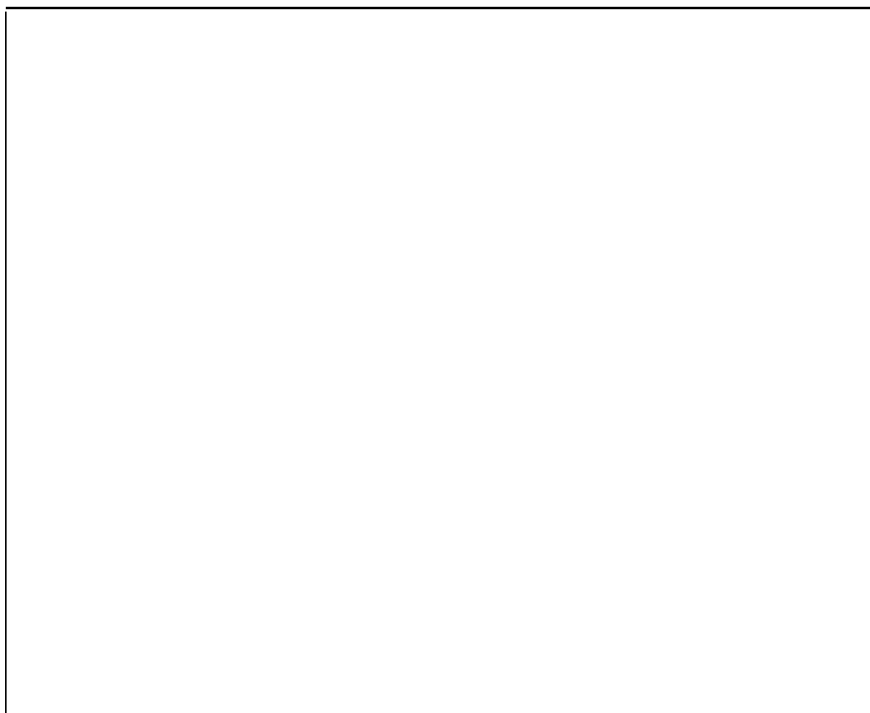
27-07-2010

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros Opinión escrita. *Notificación de cambio de domicilios de 2 inventores.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **EVANKO, William, A.**
(301 Allen Street, Golden, Colorado, Estados Unidos de América);
- 2.) **EYAL, Aharon, M.**
(16, Levy, Jesuralem, Israel);
- 3.) **GLASSNER, David, A.**
(1120 W. Rowland Avenue, Littleton, Colorado 80127, Estados Unidos de América);
- 4.) **MIAO, Fudu**
(219 Bayberry Drive Chester Springs, Pennsylvania 19425, Estados Unidos de América);
- 5.) **ARISTIDOU, Aristos, A.**
(10198 Alexa Lane, Highland Ranchs, Colorado 80130, Estados Unidos de América);
- 6.) **EVANS, Kent**
(5204 S. Everett Court Littleton, Colorado 80123, Estados Unidos de América);
- 7.) **GRUBER, Patrick, R.**
(8800 Sage Valley Road, Longmont 80503-8886, Estados Unidos de América);
- 8.) **HAWKINS, Andrew, C.**
(17377 Comerstone Drive, Parker Colorado 80134, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 9001760

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725-00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tia: 11 PATENTE/IIII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 210

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,120

FECHA : JUNIO 2 DE 2010

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	134861294	02/06/2010	98,035,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT. ENTREGADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

7-2613
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 300176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,121
FECHA : JUNIO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03.46 Dep 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 210

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	134881294	02/06/2010	95,035,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT :

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,122
FECHA : JUNIO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 210

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754327	134551294	02/06/2010	98,035,000.00

**** C O N C E P T O ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,123
FECHA : JUNIO 2 DE 2010



No. 10-077725-00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCO
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 210

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754327	134881294	02/06/2010	98,035,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176088-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,124
FECHA : JUNIO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725-00000-0000

Fecha 2010-06-28 15:03:46 Dep 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 210

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	134861294	02/06/2010	98,035,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-7

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,125
FECHA : JUNIO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 210

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	134881294	02/06/2010	98,035,000.00

**** C O N C E P T O ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SOM: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,142
FECHA : JUNIO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 210

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	134681294	02/06/2010	92,035,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		49 INSCRIPCION DE LICENCIAS Y DERECH	500,000.00
		TOTAL :	\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,143

FECHA : JUNIO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 210

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	134861294	02/06/2010	98,035,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		49 INSCRIPCION DE LICENCIAS Y DERECH	500,000.00
		TOTAL :	\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 24,990

FECHA : ABRIL 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077725- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46 Dep 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 210

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353190121	31/03/2010	84,780,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	100,000.00
		TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

RESUMEN

Esta invención se refiere a los métodos para la recuperación de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas diluidas, tales como caldos de fermentación. Dichos métodos proveen productividad volumétrica mejorada para la fermentación y permite la recuperación del alcohol. Dichos métodos también posibilitan el uso reducido de energía en la producción y el secado del caldo de fermentación utilizado debido a la concentración efectiva incrementada del producto de alcohol mediante un proceso simultáneo de fermentación y recuperación, que incrementa la cantidad de alcohol producido y recuperado por cantidad de caldo de fermentación secado. Por consiguiente, la invención posibilita la producción y la recuperación de alcoholes C3-C6 a bajos costos de capital y costos de operación reducidos.

RECUPERACIÓN DE ALCOHOLES SUPERIORES A PARTIR DE SOLUCIONES ACUOSAS DILUIDAS

CAMPO DE LA INVENCION

Esta solicitud se relaciona generalmente con los métodos para la recuperación de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas diluidas, tales como caldos de fermentación.

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/017.141, presentada el 27 de diciembre de 2007; de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/021.495, presentada el 16 de enero de 2008; de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/021.558, presentada el 16 de enero de 2008 y de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/021.567, presentada el 16 de enero de 2008. Por consiguiente, esta solicitud incorpora en su totalidad, por referencia, todo el contenido de las solicitudes mencionadas con anterioridad, para todos los propósitos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los biocombustibles tienen un largo historial que se remonta a principios del Siglo 20. Ya en 1900, Rudolf Diesel exhibió en la Exposición Mundial de París, Francia, un motor que funcionaba con aceite de cacahuete. Poco después, Henry Ford exhibió su Modelo T que funcionaba con etanol derivado de maíz. Los combustibles derivados de petróleo desplazaron a los biocombustibles en las décadas de 1930 y 1940 debido al suministro incrementado y la eficiencia a menor costo.

Las fluctuaciones del mercado en la década de 1970, debido al embargo en el petróleo árabe y la revolución iraní –junto con la reducción en la producción de petróleo estadounidense– provocó un incremento en los precios del petróleo crudo y un renovado interés en los biocombustibles. Hoy en día, muchos grupos de intereses –con inclusión de políticos, planificadores industriales, ciudadanos concientes y la comunidad financiera– están interesados en sustituir los combustibles derivados de petróleo con biocombustibles derivados de biomasa. La motivación principal para desarrollar biocombustibles es de naturaleza económica, es decir, la amenaza del “pico del petróleo” –el punto al cual la tasa de consumo del petróleo crudo excede la tasa de suministro, lo que provoca el incremento significativo del costo del petróleo– genera una creciente demanda de combustibles alternativos.

Los biocombustibles tienden a producirse con recursos agrícolas locales en muchas instalaciones relativamente pequeñas y son vistos como un suministro estable y seguro de combustibles independientes de los problemas geopolíticos asociados con el petróleo. Al mismo tiempo, los biocombustibles fortalecen el sector agrícola de las economías nacionales. Además, como las fuentes fósiles de los combustibles tardan cientos de millones de años en regenerarse, y su uso incrementa los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera, lo que ocasiona preocupaciones respecto del cambio climático, la sostenibilidad es una fuerza conductora social y étnica importante que está comenzando a generar reglamentaciones y políticas gubernamentales tales como restricciones a las emisiones de dióxido de carbono de los automóviles, impuestos a las emisiones de dióxido de carbono e incentivos impositivos en el uso de biocombustibles.

La aceptación de los biocombustibles depende principalmente de la competitividad económica de los biocombustibles cuando se compara con los combustibles derivados de petróleo. Los biocombustibles que no pueden competir en costo con los combustibles derivados de petróleo se ven limitados a las aplicaciones de especialidad y a los nichos de mercado. En la actualidad, el uso de los biocombustibles se limita al etanol y al biodiésel. Actualmente, el etanol se produce por medio de la fermentación del maíz en los Estados Unidos, la caña de azúcar en el Brasil y otros granos en todo el mundo. El etanol es competitivo con la gasolina derivada de petróleo, exenta de subsidios o beneficios impositivos, si el petróleo crudo permanece por sobre \$50 por barril. El biodiésel requiere un precio de rentabilidad de petróleo crudo de más de \$60/barril para ser competitivo con el diésel basado en petróleo (Nexant Chem Systems, 2006, Informe Final, *Liquid Biofuels: Substituting for Petroleum*, White Plains, Nueva York).

Varios factores influyen los costos de operación principales de una fuente de biocombustible basada en carbohidrato. Además del costo de la materia prima que contiene carbono producida en planta, un factor clave en los costos económicos del producto para el etanol u otros biocombustibles basados en alcohol potenciales – tal como butanol– es la recuperación y la purificación de los biocombustibles a partir de corrientes acuosas. Muchos enfoques técnicos han sido desarrollados para la extracción económica de alcoholes a partir de medios de fermentación de base acuosa. Las técnicas de recuperación más ampliamente usadas hoy en día utilizan destilación y secado por tamiz molecular para producir etanol. Por ejemplo, la producción de butanol mediante fermentación de acetona-butanol-etanol basada en *Clostridium* también se apoyó en la destilación para la recuperación y la purificación de los productos. La destilación a partir de soluciones acuosas requiere un alto

grado de energía. Para el etanol, se necesita un equipo de procesamiento adicional para desintegrar el azeótropo de etanol y agua. Este equipo (tamices moleculares) también usa cantidades significativas de energía. Muchas operaciones unitarias han sido estudiadas para la recuperación y la purificación de alcoholes producidos por la fermentación, con inclusión de filtración, extracción líquido/líquido, separaciones de membrana (por ej., filtración de flujo tangencial, pervaporación y el proceso de separación denominado "*perstraction*" mediante el cual se logra la permeación y la extracción de la membrana), barrido gaseoso y precipitación por saturación de solución, adsorción y absorción. Cada uno de los enfoques tiene ventajas y desventajas según las circunstancias del producto a ser recuperado y las propiedades físico-químicas del producto y la matriz en la que reside.

Las variables que controlan los costos de producción de los biocombustibles se pueden caracterizar como las que impactan los costos de operación, los costos de capital, o ambos. Por lo general, las variables clave que controlan el funcionamiento económico de la fermentación incluyen el rendimiento del carbohidrato respecto del producto deseado, la concentración del producto y la productividad volumétrica. Todas estas tres variables clave (rendimiento, concentración del producto y productividad volumétrica) impactan tanto en los costos de operación como en los costos de capital.

A medida que el rendimiento del producto en cuanto al carbohidrato fermentado se incrementa, los costos de producción para una determinada unidad de producto se reducen en forma lineal con relación a los costos de materia prima. El rendimiento del producto en cuanto al carbohidrato también impacta sobre el tamaño del equipo, los gastos de capital, el consumo de accesorios y los materiales

de preparación de carga de alimentación tales como enzimas, minerales, nutrientes (vitaminas) y agua. Por ejemplo, un incremento en el rendimiento del producto en cuanto a la glucosa respecto del butanol desde el 50% hasta el 90% de los resultados teóricos genera una reducción del 44% en los costos directos de operación. Además, un rendimiento incrementado del 90% reduce la cantidad de materia prima manipulada y procesada. El rendimiento incrementado reduce directamente la inversión de capital necesaria para la instalación de producción así como también todos los equipos necesarios desde la preparación del carbohidrato hasta la purificación y la recuperación se reducen en tamaño. Los requisitos de equipos, tubería y accesorios se pueden reducir al 32% si el rendimiento se incrementa del 50% al 90%. La influencia directa del rendimiento del producto sobre los costos de producción lo convierte en una influencia clave sobre el costo y la viabilidad de mercado para los biocombustibles. Un enfoque para incrementar el rendimiento del producto comprende microorganismos genéticamente manipulados (GEMs, del inglés *Genetically Engineered Microorganisms*) que se pueden construir para manipular la vía metabólica del organismo para reducir o eliminar los productos indeseados, incrementar la eficiencia del metabolito deseado, o ambos. Esto permite la supresión de los productos de bajo costo o de los productos indeseados —o ambos— lo que incrementa la producción de productos deseados.

Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 20050089979 revela un proceso de fermentación que utiliza un microorganismo *Clostridium beijerinckii* que produce una mezcla de productos que incluyen 5,3 g/L de acetona, 11,8 g/L de butanol, y 0,5 g/L de etanol. Un microorganismo genéticamente manipulado que ha sido modificado en forma apropiada elimina la producción de acetona y etanol al tiempo que incrementa la conversión de los

carbohidratos en butanol. La redirección de una de carga de alimentación de carbohidrato desde el etanol y la acetona hasta el butanol incrementa la producción de butanol desde 11.8 g/L hasta 18,9 g/L, un incremento del 60% en la producción de butanol con relación al consumo de carbohidrato. La eliminación de los subproductos de etanol y acetona también posibilita costos de capital reducidos ya que es necesario utilizar menos equipamiento para completar la recuperación y la purificación.

La aplicación de herramientas bioquímicas, que incluyen manipulación genética y desarrollo clásico de la cepa, también puede impactar sobre la concentración del producto final (g/L) y la productividad volumétrica de la fermentación (g/L-hr) del biocatalizador. La concentración del producto final y la productividad volumétrica impactan sobre varios aspectos de la economía del producto, con inclusión del tamaño del equipamiento, el uso de la materia prima y los costos de los accesorios. A medida que se incrementa la concentración del producto tolerable en la fermentación, se reducen los volúmenes de recuperación de las soluciones acuosas, lo que genera costos de capital reducido y menores volúmenes de materiales a procesar dentro de instalación de producción.

La productividad volumétrica impacta directamente sobre la capacidad del fermentador de alcanzar la misma producción de producto. Por ejemplo, una fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE) basada en *Clostridium beijerinckii* tradicional produce una relación de acetona, butanol y etanol. Los microbios genéticamente manipulados permiten la producción diseñada de un único producto, tal como n-butanol, isobutanol o 2-butanol (Donaldson y colaboradores, solicitud de patente estadounidense N° 11/586.315). Pueden identificarse los huéspedes

tolerantes a butanol utilizando técnicas para identificar y reforzar la tolerancia a butanol (Bramucci y colaboradores, solicitud de patente estadounidense N° 11/743.220). Estas dos técnicas se pueden combinar luego para producir butanol en concentraciones y productividad volumétrica comercialmente relativas. La utilización de los GEM para incrementar la productividad volumétrica y la concentración del producto puede influenciar en gran medida la economía del producto. Por ejemplo, una fermentación de butanol completada al doble de la productividad volumétrica reduce el costo del fermentador en casi el 50% para una instalación industrial de fermentación de biocombustibles. La reducción del costo de capital y tamaño del fermentador disminuye los costos de operación y depreciación para la instalación. En forma similar, si los GEM generan un organismo que es tolerante a concentraciones superiores de butanol, los costos de operación y capital se reducen para un determinado volumen de producción. Por ejemplo, si una cepa silvestre es capaz de tolerar 20 g/L de butanol y un microorganismo genéticamente mejorado o genéticamente reforzado correspondiente tolera 40 g/L de butanol, la carga de agua en el volumen del caldo del fermentador manipulada en el equipo de recuperación y purificación corriente abajo se reduce a la mitad. En este ejemplo, el doblar la concentración del producto en el caldo de fermentación deja casi a la mitad la cantidad de agua a ser recuperada y procesada en las operaciones unitarias de recuperación.

Un gran número de componentes de costo menor también impactan sobre los costos de operación y capital para la producción de biocombustibles. Los factores de ejemplo que pueden impactar sobre la fermentación incluyen –mas no se limitan a – aditivos químicos, control del pH, agentes tensioactivos y contaminación. Estos son

algunos de los factores, pero muchos otros factores pueden impactar sobre el costo del producto de fermentación.

SUMARIO DE LA INVENCION

En una forma de realización, la presente invención provee un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de un caldo de fermentación que contiene microorganismos y el alcohol C3-C6. El método incluye el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del caldo de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción. En forma alternativa, el método puede incluir el paso de reducir la actividad del agua en una porción del caldo de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción. El método también incluye el paso de formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la porción del caldo de fermentación. El método también incluye el paso de separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para producir un alcohol C3-C6. El método incluye el paso de cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6. El método también incluye el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del medio de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en el medio de fermentación. El método también incluye el paso de formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase rica en agua a partir de la porción del medio de fermentación. El método también incluye el paso de separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua. El método también incluye el paso de conducir la fase rica en agua hasta el medio de fermentación.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para producir un alcohol C3-C6. El método incluye hidrolizar una carga de alimentación que comprende un polisacárido y al menos otro compuesto para producir productos de hidrólisis fermentables. El método también incluye fermentar al menos una porción de los productos de hidrólisis fermentables en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6, en donde el medio de fermentación incluye, además, al menos un compuesto no fermentado. El método también incluye incrementar la actividad del alcohol C3-C6 de una porción del medio de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en el medio de fermentación. El método también incluye formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase rica en agua a partir de la porción del medio de fermentación. El método también incluye separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua. El método también incluye separar dicho al menos un compuesto no fermentado del medio de fermentación, la fase rica en agua, o ambos. En algunas formas de realización, el paso de hidrolizar una carga de alimentación incluye sacarificación. En algunas formas de realización, al menos dos de los pasos seleccionados entre hidrolizar, fermentar e incrementar la actividad del alcohol C3-C6 se realizan de manera simultánea durante al menos un lapso de tiempo. En algunas formas de realización, el paso de fermentar se realiza con un microorganismo que es capaz de hidrolizar la carga de alimentación.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para producir un producto a partir de un alcohol C3-C6 en un caldo de fermentación que incluye microorganismos y el alcohol C3-C6. El método incluye los pasos de destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 a partir del caldo de fermentación y hacer reaccionar el alcohol C3-C6 en la fase de vapor para formar el

producto. En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es propanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase de vapor es superior a alrededor de 0,2 (p/p). En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es butanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase de vapor es superior a alrededor de 1 (p/p). En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es pentanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase de vapor es superior a alrededor de 4 (p/p). En algunas formas de realización, el paso de reacción se realiza en presencia de un catalizador. En algunas formas de realización, el catalizador es un catalizador heterogéneo.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para producir un alcohol C3-C6. Este método incluye los pasos de cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6. Este método también incluye el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del medio de fermentación. El método también incluye el paso de destilar la porción del medio de fermentación para producir una fase de vapor que incluye agua y alcohol C3-C6 y una fase líquida, y el paso de conducir la fase líquida hasta el medio de fermentación.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa diluida que incluye una primera cantidad del alcohol C3-C6. El método incluye destilar una porción de la solución acuosa diluida a una fase de vapor que contiene alcohol C3-C6 y agua, en donde la fase de vapor contiene entre alrededor del 1% en peso y alrededor del 45% en peso de la primera cantidad de alcohol C3-C6 a partir de la porción de la solución acuosa diluida. El método incluye, además, condensar la fase de vapor. En varias

formas de realización, la fase de vapor puede contener entre alrededor del 2% en peso y alrededor del 40%, entre alrededor del 3% en peso y alrededor del 35%, entre alrededor del 4% en peso y alrededor del 30%, o entre alrededor del 5% en peso y alrededor del 25% en peso del alcohol C3-C6 a partir de la solución acuosa diluida. En algunas formas de realización, el método incluye formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la fase de vapor condensado. En algunas formas de realización, el método incluye separar la fase rica en alcohol C3-C6 y la fase rica en agua. En algunas formas de realización, el paso de destilación es destilación de una sola etapa. La destilación puede ser adiabática o isotérmica. En varias formas de realización, el enriquecimiento del alcohol desde la solución acuosa diluida al vapor condensado puede ser al menos de alrededor de 5 veces, al menos de alrededor de 10 veces, o al menos de alrededor de 15 veces.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para operar una planta de producción de etanol reestructurada (*retrofit*). En algunas formas de realización, la planta reestructurada incluye una unidad de pretratamiento, múltiples unidades de fermentación, y un alambique (*beer still*) para producir un alcohol C3-C6. El método incluye pretratar una carga de alimentación para formar azúcares fermentables en la unidad de pretratamiento. El método también incluye cultivar un microorganismo en un medio de fermentación que comprende los azúcares fermentables en una primera unidad de fermentación para producir el alcohol C3-C6. El método también incluye tratar una porción del medio de fermentación que comprende el alcohol C3-C6 para extraer una porción del alcohol C3-C6. El método también incluye devolver la porción tratada del medio de fermentación a la primera unidad de fermentación. El método también incluye

transferir el medio de fermentación desde la primera unidad de fermentación hasta el alambique. En varias formas de realización, la producción de alcohol C3-C6 de la planta reestructurada es al menos de alrededor del 80%, al menos de alrededor del 90%, o al menos de alrededor del 95% del alcohol C3-C6 equivalente de la producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método de extracción de un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa. El método incluye poner en contacto la solución acuosa con un extractor ácido basado en amina selectivo de alcohol. En algunas formas de realización, se forman dos fases después del paso de contacto. En algunas formas de realización, el extractor ácido basado en amina se forma al acidificar una solución de amina orgánica.

En varias formas de realización, la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación o medio de fermentación puede ser inferior a alrededor de 9/91 (p/p), inferior a alrededor de 6/94 (p/p) o inferior a alrededor de 3/97 (p/p).

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad puede incluir la adición de un soluto hidrófilo. En algunas formas de realización, este paso puede incluir destilar una fase de vapor que contiene agua y alcohol C3-C6. En algunas formas de realización, este paso puede incluir osmosis inversa. En algunas formas de realización, este paso puede incluir diálisis. En algunas formas de realización, este paso puede incluir adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo de alcohol. En algunas formas de realización, este paso puede incluir la extracción del alcohol C3-C6 en un extractor selectivo de alcohol. En algunas formas de realización, este paso puede incluir la adsorción del agua sobre

un adsorbente selectivo de agua. En algunas formas de realización, este paso puede incluir la extracción del agua en un extractor selectivo de agua. En algunas formas de realización, este paso puede incluir extracción selectiva del agua, unión selectiva del agua o rechazo selectivo del agua.

En varias formas de realización, el alcohol C3-C6 es propanol, butanol, pentanol o hexanol. En algunas formas de realización, el propanol puede ser 1-propanol ó 2-propanol. En algunas formas de realización, el butanol puede ser 1-butanol, 2-butanol, ter-butanol (2-metil-2-propanol), o isobutanol (2-metil-1-propanol). En algunas formas de realización, el pentanol puede ser 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol, o 2,2-dimetil-1-propanol. En algunas formas de realización, el hexanol puede ser 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, o 2-etil-1-butanol. En una forma de realización preferida, el alcohol C3-C6 es isobutanol.

En algunas formas de realización, el método de la presente invención incluye, además, el paso de enfriar la fase rica en alcohol para incrementar la relación del alcohol con respecto al agua en la fase rica en alcohol.

En algunas formas de realización, el método incluye el paso de recuperar el alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol. En varias formas de realización, el paso de recuperación puede incluir el paso de destilación, diálisis, adsorción del agua, extracción del alcohol C3-C6 mediante extracción por solvente, contacto con un líquido hidrocarburo que es inmisible en agua o contacto con un compuesto

hidrófilo. Este paso puede producir dos fases que incluyen una primera fase que contiene el alcohol C3-C6 y agua y una segunda fase que contiene el alcohol C3-C6, en donde la relación del agua con respecto al alcohol C3-C6 en la segunda fase es menor que en la primera fase. En varias formas de realización, la segunda fase puede contener al menos alrededor del 90% en peso de alcohol, al menos alrededor del 95% en peso de alcohol o al menos alrededor del 99% en peso de alcohol.

En algunas formas de realización, el paso de recuperación puede incluir destilar la fase rica en alcohol C3-C6. En dicha formas de realización, la primera fase es una fase de vapor que contiene el alcohol y agua, y la segunda fase es un producto de alta ebullición que contiene el alcohol. En algunas formas de realización, el método puede incluir, además, combinar el caldo de fermentación con el producto de alta ebullición, antes del paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6. En algunas formas de realización, el método puede incluir combinar el caldo de fermentación con la fase rica en agua antes del paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6.

En algunas formas de realización, después del paso de incrementar la actividad, la porción restante de la solución acuosa diluida puede conducirse a un recipiente de fermentación. En algunas formas de realización, la porción restante puede contener una impureza y el método incluye, además, extraer al menos una porción de la impureza de al menos una porción de la porción restante antes de conducir la solución al recipiente de fermentación. En algunas formas de realización, el caldo de fermentación contiene una impureza y la relación de la impureza con respecto al alcohol C3-C6 en la fase líquida rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación en la fase rica en agua.

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 puede incluir destilar una fase de vapor que contiene agua y alcohol, y condensar la fase de vapor. En algunas de estas formas de realización, la porción del caldo de fermentación se puede tratar para la extracción del agua antes del paso de destilación. En algunas formas de realización, la fase rica en alcohol C3-C6 se puede tratar para la extracción del agua. En algunas formas de realización, la extracción del agua se puede realizar de manera simultánea con el paso de destilación. La extracción del agua puede hacerse mediante extracción selectiva del agua, unión selectiva del agua o rechazo selectivo del agua. En varias formas de realización, la extracción del agua puede efectuarse mediante adición de un soluto hidrófilo, adición de una fuente de carbono, osmosis inversa, diálisis, adsorción del alcohol sobre un adsorbente selectivo de alcohol, extracción del alcohol en un extractor selectivo de alcohol, adsorción del agua sobre un adsorbente selectivo de agua o extracción del agua en un extractor selectivo de agua.

En algunas formas de realización, la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación en al menos de alrededor de 5 veces.

En algunas formas de realización, la destilación se realiza por debajo de la presión atmosférica y a una temperatura que oscila entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C. En algunas formas de realización, el paso de destilación se realiza a una presión que abarca desde alrededor de 0,025 bar hasta alrededor de 10 bar. El paso de destilación se puede realizar en un recipiente de fermentación o en un recipiente de destilación. En algunas formas de realización, la porción del

caldo de fermentación se encuentra a la temperatura que oscila entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C antes de la introducción en el recipiente de destilación. En algunas formas de realización, la porción del caldo de fermentación se somete a una presión por debajo de la atmosférica en el recipiente de destilación. En algunas formas de realización, después del paso de destilación, la porción restante del caldo de fermentación se realiza desde el recipiente de destilación hasta el recipiente de fermentación. En varias formas de realización, el recipiente de fermentación puede encontrarse a presión atmosférica, por debajo de la presión atmosférica o por sobre la presión atmosférica.

En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es propanol y la relación del alcohol con respecto al agua en la fase rica en alcohol es superior a alrededor de 0,2 (p/p). En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es butanol y la relación del alcohol con respecto al agua en la fase rica en alcohol es superior a alrededor de 1 (p/p). En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es pentanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a alrededor de 4 (p/p).

En algunas formas de realización, cuando el paso de incrementar la actividad del alcohol incluye destilar una fase de vapor que contiene agua y el alcohol C3-C6 y condensar la fase de vapor, la fase de vapor puede contener un azeótropo de agua y el alcohol. En algunas formas de realización, la relación del alcohol con respecto al agua en la fase rica en alcohol es superior a la relación en el azeótropo.

En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención incluyen, además, procesar la fase rica en alcohol C3-C6. En algunas formas de realización, el paso de procesamiento puede incluir destilar alcohol C3-C6

sustancialmente puro de la fase rica en alcohol C3-C6. En algunas formas de realización, el procesamiento puede incluir destilar azeótropo del alcohol C3-C6 a partir de la fase rica en alcohol C3-C6. En algunas formas de realización, el procesamiento puede incluir poner en contacto la fase rica en alcohol C3-C6 con un adsorbente selectivo de alcohol C3-C6. En algunas formas de realización, el procesamiento puede incluir convertir el alcohol C3-C6 en la fase rica en alcohol C3-C6 en una olefina. En algunas formas de realización, el procesamiento puede incluir combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua. En algunas formas de realización, la combinación puede formar una única fase uniforme. En algunas formas de realización, la combinación puede formar una fase liviana y una fase pesada y la relación del alcohol con respecto al agua en la fase liviana puede ser superior a la relación en la fase pesada.

En algunas formas de realización, el paso de cultivo puede incluir el proceso de fermentación por lote, una fermentación por lote alimentado, fermentación continua, fermentación con reciclado celular, o un proceso de reacción enzimática. En algunas formas de realización, el microorganismo puede ser *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutlicum*, *Clostridium saccharoperbutilacetonicum*, *Clostridium saccharobutlicum* o *Clostridium beijerickii*. En algunas formas de realización, el microorganismo puede ser un microorganismo resistente a la temperatura. En algunas formas de realización, el microorganismo puede ser viable a temperaturas que abarcan desde alrededor de 20 °C hasta alrededor de 95 °C. En algunas formas de realización, el microorganismo puede tener una productividad de al menos de alrededor de 0,5 g/L por hora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa una forma de realización de la presente invención para la producción y la recuperación de isobutanol.

La Figura 2 representa una forma de realización de la presente invención para la producción y la recuperación de butanol a partir del caldo de fermentación en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación de maíz pretratado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención describe métodos para la recuperación de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas diluidas, tales como caldos de fermentación. La fermentación y la recuperación se pueden llevar a cabo de manera simultánea. La combinación de la recuperación durante la fermentación tiene varias ventajas económicas clave. Esta combinación provee productividad volumétrica mejorada para la fermentación y posibilita la recuperación del alcohol. Una ventaja económica adicional es la reducción en la energía requerida para secar el caldo de fermentación utilizado. Esta reducción aparece porque la concentración por lote del producto de alcohol recuperado para una determinada fermentación se eleva mediante el proceso simultáneo de fermentación y recuperación, lo que incrementa la cantidad de alcohol producido y recuperado por cantidad de caldo de fermentación secado. El término "concentración por lote" se refiere a la concentración para un determinado volumen del fermentador sobre la base de todo el alcohol C3-C6 producido durante la fermentación por lote incluso si se extrae parte del alcohol C3-C6 durante la fermentación. Por ende, la presente invención posibilita la producción y la recuperación de alcoholes C3-C6 a bajos costos de capital y costos operativos reducidos.

Las expresiones "fermentación" o "proceso de fermentación" se definen como un proceso mediante el cual un biocatalizador es desarrollado en un medio de cultivo que contiene materia prima –tal como carga de alimentación y nutrientes– en el cual el biocatalizador convierte la materia prima –tal como una carga de alimentación– en los productos. Un biocatalizador, y los procesos de fermentación relacionados, adecuados para la presente invención se analizan en detalle en las solicitudes de patentes estadounidenses N° 12/263.436 y N° 12/263.442, presentadas el 31 de octubre de 2008; la solicitud provisional estadounidense N° 61/110.543, presentada el 31 de octubre de 2008, y la solicitud provisional estadounidense N° 61/121.830, presentada el 11 de diciembre de 2008, que se incorporan por referencia en su totalidad. El biocatalizador puede ser cualquier microorganismo capaz de convertir una carga de alimentación seleccionada en el alcohol C3-C6 deseado. Otros aspectos del biocatalizador se analizan a continuación. Cualquier carga de alimentación que contiene una fuente de carbono fermentable es adecuada para la presente invención.

Las expresiones "caldo de fermentación" y "medio de fermentación" son sinónimos. A menos que se aclare específicamente, debería considerarse que la expresión "caldo de fermentación" incluye tanto el caldo de fermentación que contiene microorganismos como el caldo de fermentación que no contiene microorganismos.

En una forma de realización, la presente invención incluye un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa diluida del alcohol C3-C6, tal como un caldo de fermentación que comprende los microorganismos y el alcohol C3-C6. Este método incluye incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en

una porción de la solución acuosa hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción. La expresión "saturación del alcohol C3-C6 en la solución acuosa" hace referencia a la concentración máxima del alcohol C3-C6 bajo las condiciones (por ej. temperatura y presión) de esa solución acuosa. El método también incluye formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la porción de la solución acuosa, y el método incluye separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua.

En una forma de realización alternativa, la presente invención incluye un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa diluida del alcohol C3-C6, tal como un caldo de fermentación que comprende los microorganismos y el alcohol C3-C6. Este método incluye reducir la actividad del agua en una porción de la solución acuosa a al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción. El método también incluye formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la porción de la solución acuosa, y el método incluye separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua. Un ejemplo del paso de incrementar la actividad de un alcohol es cuando se extrae un alcohol en forma selectiva a comparación del agua para formar otra fase, tal como mediante destilación, extracción y adsorción cuando la otra fase es gaseosa, solvente y adsorbente del sólido, respectivamente. Ante la condensación de la fase gaseosa, la separación a partir del solvente o la separación a partir del adsorbente, se forma una segunda fase líquida en la cual la actividad del alcohol es superior a la solución de inicio. Un ejemplo del paso de reducir la actividad del agua es cuando se extrae el agua en forma selectiva a comparación del alcohol para formar otra fase, tal como adsorción selectiva, extracción e incluso congelamiento del agua. El resultado es la reducción de la actividad del agua en la solución de

inicio. Algunos procesos incrementan la actividad de un alcohol y también reducen la actividad del agua. Por ejemplo, si se agrega un soluto hidrófilo a una solución acuosa de un alcohol, provoca tanto la reducción de la actividad del agua como el incremento de la actividad del alcohol.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "alcohol C3-C6" hace referencia a un alcohol que contiene tres, cuatro, cinco ó seis átomos de carbono, con inclusión de todos sus isómeros, y mezclas de cualquiera de ellos. Por ende, el alcohol C3-C6 se puede seleccionar entre: propanoles, butanoles, pentanoles y hexanoles. Más particularmente, el alcohol C3 puede ser 1-propanol ó 2-propanol; el alcohol C4 puede ser 1-butanol, 2-butanol, ter-butanol (2-metil-2-propanol) o isobutanol (2-metil-1-propanol); el alcohol C5 puede ser 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2- metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol ó 2,2-dimetil- 1-propanol; y el alcohol C6 puede ser 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol ó 2 etil-1-butanol. En una forma de realización preferente, el alcohol C3-C6 es isobutanol (2-metil-1-propanol).

Una solución acuosa "diluida" –tal como se utiliza en la presente– hace referencia a una solución que contiene el alcohol C3-C6 a una concentración por debajo del límite de solubilidad del alcohol C3-C6 en la solución. La concentración se puede expresar en una variedad de diferentes unidades, por ej. porcentaje en peso o volumen, concentración molar, concentración molal o relación alcohol/agua p/p de v/v. No obstante, a menos que se indique lo contrario, las concentraciones se

presentan en esta descripción como porcentaje en peso. En el caso de una corriente que comprende al menos un compuesto adicional (por ej. soluto, solvente, adsorbente, etc.), concentración en peso del alcohol, tal como se utiliza en la presente, se calcula por 100 veces el peso del alcohol en esa corriente dividido por los pesos combinados de alcohol y agua en esa corriente. En algunas formas de realización, la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la solución acuosa diluida es inferior a alrededor de 10/90 (p/p). En algunas formas de realización preferentes, la relación es inferior a alrededor de 9/91 (p/p), inferior a alrededor de 8/92 (p/p), inferior a alrededor de 7/93 (p/p), inferior a alrededor de 6/94 (p/p), inferior a alrededor de 5/95 (p/p), inferior a alrededor de 4/96 (p/p), inferior a alrededor de 3/94 (p/p), inferior a alrededor de 2/98 (p/p), inferior a alrededor de 1/99 (p/p) o inferior a alrededor de 0,5/99,5 (p/p).

En algunas formas de realización, la solución acuosa diluida puede comprender un caldo de fermentación. En otras formas de realización puede ser una corriente reciclada del caldo de fermentación y/o un producto del procesamiento del mismo, tal como la fase rica en agua a partir del paso de separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua o el producto de alto punto de ebullición que comprende el alcohol C3-C6 descrito a continuación, o combinaciones de los mismos con un caldo de fermentación. El caldo de fermentación puede comprender los alcoholes C3-C6, junto con cualesquiera impurezas. El término "impureza" o "impurezas" hace referencia a cualquier compuesto distinto del agua y el alcohol que están purificándose. El término "impureza" incluye cualquier subproducto o co-producto del proceso de fermentación, es decir, un producto relacionado con la producción del alcohol, distinto del alcohol, en cualquier cantidad o en una cantidad

indeseada. En la presente, "purificación" hace referencia al incremento de la relación entre un producto y otro compuesto distinto del agua.

El método incluye incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción de la solución acuosa hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción. Tal como se utiliza en la presente, el término "porción" de una cosa, tal como un caldo de fermentación, incluye tanto la cosa entera (por ej., un caldo de fermentación entero) como alguna parte de la cosa entera que es menor a la cosa entera (por ej., una corriente lateral de un caldo de fermentación). Una porción de una solución o de un caldo de fermentación también incluye la solución o el caldo de fermentación si se convierte en fase de vapor. La "actividad de un alcohol C3-C6" se refiere a la concentración efectiva del alcohol C3-C6 en una solución acuosa. La actividad del alcohol C3-C6 depende de la temperatura, presión y composición. La actividad de una especie puede ser cambiada o modificada porque las moléculas en una solución no ideal, tal como un medio de fermentación, interactúan entre sí e interactúan en forma diferente con diferentes tipos de moléculas. Por ejemplo, si se introduce un soluto hidrófilo en una solución acuosa de isobutanol, el soluto hidrófilo interactuará con mayor afinidad con el agua en la solución que con el isobutanol. Por ende, la actividad del isobutanol en la solución se incrementará. El coeficiente de actividad para un compuesto en una solución acuosa es un indicador de qué concentración de ese compuesto se encontrará en una fase de vapor en equilibrio con la solución y es una función de la concentración del compuesto en agua. La actividad de un compuesto en una solución es el producto de la concentración del compuesto y su coeficiente de actividad. Por ejemplo, en una mezcla de isobutanol y agua, el coeficiente de actividad para el isobutanol es superior al del agua. Por esta

razón, la concentración del isobutanol en la fase de vapor en equilibrio con la solución acuosa será superior que en la solución.

La expresión "incrementar la actividad del alcohol C3-C6 hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en una solución acuosa" se refiere a procesar una porción de la solución acuosa para formar una composición que comprende alcohol C3-C6 en la cual la concentración efectiva del alcohol C3-C6 con respecto a la solución acuosa es mayor que en la porción inicial. Este paso promueve la condición de que parte del alcohol C3-C6 ya no es soluble en la solución acuosa y posibilita la formación de una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua. Dicho procesamiento puede comprender una variedad de pasos de proceso que incluyen –mas no se limitan a– adición de un soluto hidrófilo, destilación de una fase de vapor que comprende agua y el alcohol C3-C6, osmosis inversa, diálisis, adsorción selectiva y extracción por solvente.

Tal como se utiliza en la presente, el término "diálisis" hace referencia a la transferencia selectiva del agua desde la solución hasta una membrana en otro compartimiento. La diálisis difiere de la osmosis inversa por el hecho de que, en la osmosis inversa, la transferencia del agua es inducida al aplicar presión sobre la solución de alcohol, mientras que en la diálisis, la transferencia del agua es inducida a un compartimiento al tener una solución concentrada dentro del compartimiento.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, incrementar la actividad del alcohol C3-C6 puede comprender agregar un soluto hidrófilo a la solución acuosa. En algunas formas de realización en las cuales la solución acuosa es un caldo de fermentación, el soluto hidrófilo se puede agregar al caldo de fermentación entero en el fermentador o a una corriente parcial tomada del

fermentador, ya sea con los microorganismos en el caldo o después de la extracción de los mismos. La referencia a “agregar un soluto hidrófilo” puede significar incrementar la concentración de un soluto hidrófilo ya existente en la porción de la solución o a la adición de un soluto hidrófilo que no estaba previamente en la solución. Dicho incremento en la concentración se puede realizar mediante adición externa. En forma adicional o alternativa, el paso de incrementar la concentración también se puede llevar a cabo mediante tratamiento *in situ* de la solución, tal como al hidrolizar un soluto ya existente en la solución, por ej. hidrolizar proteínas para agregar aminoácidos a la solución, hidrolizar almidón o celulosa para agregar glucosa a la solución y/o hidrolizar hemicelulosa para agregar pentosas a la solución. De acuerdo con otra forma de realización preferente, el soluto hidrófilo puede ser uno que tiene un valor nutricional y, opcionalmente, genera una corriente de coproducto de fermentación, tal como granos secos con solubles de destilerías (DDGS, del inglés *Distiller's Dried Grains with Solubles*). En forma adicional o alternativa, el soluto hidrófilo puede ser fermentable y se puede transferir con la fase líquida rica en agua al fermentador.

Se agrega suficiente soluto hidrófilo para permitir la formación de una segunda fase líquida, ya sea únicamente mediante la adición del soluto hidrófilo o bien en combinación con otros pasos de proceso. La cantidad requerida depende de la naturaleza química del alcohol; se reduce típicamente con el número creciente de átomos de carbono en el alcohol y es menor para los alcoholes normales y los lineales en comparación con los alcoholes secundarios o terciarios y los ramificados. La cantidad requerida se reduce, además, al incrementarse la concentración del alcohol en el líquido de fermentación y posiblemente también al incrementarse la

concentración de otros solutos en el mismo. La cantidad requerida en cada caso se puede determinar, a la luz de la presente invención, de manera experimental.

Los solutos hidrófilos preferidos son aquéllos que tienen un efecto fuerte de disminuir la presión de vapor parcial del agua de las soluciones acuosas. El soluto hidrófilo agregado puede ser una sal, un aminoácido, un solvente soluble en agua, un azúcar o combinaciones de los mismos. En las formas de realización relacionadas, el soluto hidrófilo puede ser recuperado. Por ejemplo, si la solución acuosa diluida es caldo de fermentación y el soluto hidrófilo agregado para incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en el caldo de fermentación es CaCl_2 , entonces el CaCl_2 , después de la formación de la fase líquida rica en alcohol y la fase líquida rica en agua, se encontrará principalmente en la fase líquida rica en agua y puede recuperarse de la misma.

En algunas formas de realización, el soluto hidrófilo puede ser una fuente de carbono soluble en agua. En las formas de realización en las cuales la solución acuosa es un caldo de fermentación, la fuente de carbono soluble en agua puede agregarse al caldo de fermentación entero en el fermentador o a una corriente parcial tomada del fermentador, ya sea con los microorganismos en el caldo o después de la extracción de los mismos. El agregar una fuente de carbono soluble en agua puede referirse a incrementar la concentración de una fuente de carbono soluble en agua ya existente en la porción de la solución o a la adición de un soluto hidrófilo que no estaba previamente en la solución. Dicho incremento en la concentración se puede efectuar mediante adición externa. En forma adicional o alternativa, el paso de incrementar la concentración también se puede realizar mediante tratamiento *in situ* de la solución, tal como al hidrolizar una fuente de

carbono ya existente en la solución, por ej. hidrolizar proteínas para agregar aminoácidos a la solución, hidrolizar almidón o celulosa para agregar glucosa a la solución y/o hidrolizar hemicelulosa para agregar pentosas a la solución. De acuerdo con otra forma de realización preferente, la fuente de carbono soluble en agua puede tener un valor nutricional y, opcionalmente, puede generar una corriente de coproducto de fermentación, tal como granos secos con solubles de destilerías (DDGS).

La fuente de carbono soluble en agua preferente es aquélla que tiene un efecto fuerte de disminuir la presión de vapor parcial del agua de las soluciones acuosas y aquélla que es bien fermentada. La fuente de carbono soluble en agua agregada puede ser un carbohidrato tal como un monosacárido, un disacárido o un oligosacárido y sus combinaciones. Dicho sacárido puede comprender hexosas, por ej. glucosa y fructosa y pentosas (por ej. xilosa o arabinosa) y su combinación. También es adecuado un precursor de dicho carbohidrato, tal como almidón, celulosa, hemicelulosa y sucrosa o combinaciones de los mismos. En las formas de realización relacionadas, la fuente de carbono soluble en agua se puede recuperar o usar. Por ejemplo, si la solución acuosa diluida es una porción de un caldo de fermentación y la fuente de carbono soluble en agua agregada para incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en el caldo de fermentación es glucosa, entonces la glucosa se encontrará principalmente en una fase líquida rica en agua y puede conducirse nuevamente al caldo de fermentación para proveer carbono para fermentación.

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y el

alcohol C3-C6. La solución acuosa, tal como un caldo de fermentación, puede destilarse, en cuyo caso el alcohol y el agua se vaporizan para formar una fase líquida carente de alcohol y una fase de vapor enriquecida en alcohol. El paso de destilación se puede alcanzar al incrementar la temperatura de la solución acuosa, reducir la presión atmosférica sobre la solución acuosa o alguna combinación de dichos pasos. La concentración del alcohol C3-C6 en la fase de vapor es mayor que en la solución acuosa. De acuerdo con una forma de realización preferente, la concentración del alcohol C3-C6 en la fase de vapor es al menos alrededor de 5 veces superior a la concentración en la solución acuosa, preferentemente alrededor de 10 veces, preferentemente alrededor de 15 veces, preferentemente alrededor de 20 veces, preferentemente alrededor de 25 veces, y preferentemente alrededor de 30 veces. La fase de vapor puede condensarse, tal como bajo las condiciones seleccionadas de manera que se formen soluciones inmiscibles ricas en alcohol y ricas en agua (es decir, pobres en alcohol).

El paso de destilación se puede realizar por debajo de la presión atmosférica, aproximadamente a presión atmosférica o por encima de la presión atmosférica. "Presión atmosférica" en la presente hace referencia a la presión atmosférica al nivel del mar y, a menos que se indique lo contrario, todas las presiones expresadas en la presente son presiones absolutas. La presión por debajo de la presión atmosférica adecuada incluye la presión que abarca desde alrededor de ,025 bar hasta alrededor de 1,01 bar, desde alrededor de 0,075 bar hasta alrededor de 1,01 bar, y desde alrededor de 15 bar hasta alrededor de 1,01 bar. La presión por sobre la presión atmosférica incluye la presión que abarca desde alrededor de 1,01 bar hasta alrededor de 10 bar, desde alrededor de 1,01 bar hasta alrededor de 6 bar, y desde alrededor de 1,01 bar hasta alrededor de 3 bar.

En la forma de realización en la cual el paso de destilación se realiza por debajo de la presión atmosférica, la temperatura puede oscilar entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C, entre alrededor de 25 °C y alrededor de 95 °C, entre alrededor de 30 °C y alrededor de 95 °C, o entre alrededor de 35 °C y alrededor de 95 °C.

En otra forma de realización, en la cual la solución acuosa es una porción de un caldo de fermentación y comprende microorganismos, y en la cual el paso de destilación se realiza en un recipiente de destilación, la porción del caldo de fermentación se encuentra a una temperatura que oscila entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C, entre alrededor de 25 °C y alrededor de 95 °C, entre alrededor de 30 °C y alrededor de 95 °C, o entre alrededor de 35 °C y alrededor de 95 °C antes de la introducción en el recipiente de destilación. En otra forma de realización, la temperatura de la porción del caldo de fermentación se lleva al valor deseado después de que se introduce en el recipiente de destilación. Preferentemente, se usan los microorganismos que son viables; incluso más preferentemente, tanto viables como productivos a estas temperaturas.

Opcionalmente, después del paso de destilación, la porción carente de alcohol restante del caldo de fermentación puede conducirse desde el recipiente de destilación hasta un recipiente de fermentación. Opcionalmente, la porción carente de alcohol restante del caldo de fermentación se puede mezclar con agua, con carga de alimentación y/o posiblemente con otros nutrientes para formar el medio de cultivo para fermentación adicional.

En otra forma de realización, en la cual la porción de la solución acuosa es una porción de un caldo de fermentación, el paso de destilación se puede realizar en un recipiente de fermentación.

En el caso en que el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 y condensar la fase de vapor, el método también puede incluir tratar la porción de la solución acuosa diluida para reducir la actividad del agua. En varias formas de realización, dicha reducción de la actividad del agua comprende la extracción del agua antes del paso de destilación o de manera simultánea con el paso de destilación. El paso de tratamiento puede incluir extracción selectiva del agua, unión selectiva del agua o rechazo selectivo del agua. De acuerdo con varias formas de realización, el paso de tratamiento puede incluir adición de un soluto hidrófilo, adición de una fuente de carbono, osmosis inversa, diálisis, adsorción del alcohol sobre un adsorbente selectivo, extracción del alcohol en un extractor selectivo, adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo, o extracción de agua en un extractor selectivo.

En otra forma de realización en la cual el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 y condensar la fase de vapor, el método también puede incluir tratar la fase rica en alcohol C3-C6 para la extracción del agua. El paso de tratamiento puede incluir extracción selectiva del agua, unión selectiva del agua o rechazo selectivo del agua. En forma alternativa, el paso de tratamiento puede incluir adición de un soluto hidrófilo, adición de una fuente de carbono, osmosis inversa, diálisis, adsorción del butanol sobre un adsorbente selectivo, extracción del butanol en un extractor

selectivo, adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo o extracción de agua en un extractor selectivo.

En una forma de realización preferente, el paso de destilación se realiza en un tanque de destilación súbita (*flash*), que puede estar conectado en forma operativa a un recipiente de fermentación y el proceso puede comprender, además, hacer circular el medio de cultivo desde el recipiente de fermentación hasta el tanque flash o de destilación súbita, y hacer circular el medio de cultivo desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación. Una destilación súbita (*flash*) es una destilación en una sola etapa, en la cual la salida del líquido y del vapor desde el sistema de destilación súbita están en equilibrio entre sí y la temperatura y la presión de cada fase es casi idéntica. La destilación, por otro lado, comprende una serie de etapas súbitas que se encadenan de manera secuencial. Durante la destilación, es decir, en un sistema de múltiples etapas, tal como una columna de destilación, el vapor sale desde el tope y el líquido sale desde el fondo a temperaturas diferentes en comparación con una destilación súbita.

De acuerdo con otra forma de realización, el proceso incluye reducir la presión en un recipiente de destilación en comparación con aquella en el recipiente de fermentación. Dicha reducción de la presión junto con la vaporización adiabática permite la extracción del calor de la porción del caldo de fermentación de la solución acuosa generada en el recipiente de fermentación dentro del recipiente de destilación. En forma adicional o alternativa, el proceso puede incluir incrementar la presión sobre la solución acuosa del recipiente de destilación en el recipiente de fermentación. Dicho incremento de la presión crea calor, que se puede usar para precalentar el sistema en varios puntos. Por ejemplo, el calor se puede usar para

precalentar la alimentación en el tanque flash, el alambique y/o la columna de destilación y también se puede usar en los evaporadores usados para concentrar la vinaza delgada en jarabe. Estos componentes se analizan en detalle a continuación.

Las operaciones de evaporación al vacío del tanque flash tienen menos complicaciones de ingeniería con respecto a la caída de la presión bajo vacío porque el tanque flash actúa como una única etapa de separación sin que las etapas de líquido sobre el tanque flash impacten sobre la caída de la presión en el sistema, y la presión diferencial en las operaciones del tanque flash puede ser muy baja. Los cálculos de diseño para la generación de vapor en el tanque flash y el ajuste de los sistemas de tubería pueden seleccionarse en forma apropiada para alcanzar una caída de presión baja. La destilación de un alcohol C3-C6 en un tanque flash requiere menos vacío que una columna de destilación y, por ende, el tanque flash tiene costos de operación y de capital inferiores ya que el equipo es menor en tamaño y más sencillo de construir.

En una forma de realización preferente, en la que el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y el alcohol C3-C6, el vapor mixto incluye una composición azeotrópica. Los azeótropos se forman cuando las fuerzas moleculares hacen que dos o más especies moleculares se comporten como una especie líquida o de vapor nueva. Los azeótropos son vistos generalmente como una limitación por las industrias de procesos químicos ya que el "punto de estancamiento" de la composición azeotrópica evita la destilación de la mezcla en componentes puros. En vez de producir componentes puros del proceso de destilación, el azeótropo se manifiesta como una composición azeotrópica en el tope de la columna de destilación, como un

azeótropo de punto de ebullición mínimo, o desde el fondo de la columna de destilación, como un azeótropo de punto de ebullición máximo.

Cuando los productos de fermentación forman un azeótropo de punto de ebullición máximo con el agua, toda el agua no combinada con el azeótropo debe ser vaporizada y destilada desde el tope. Los productos dentro del caldo de fermentación están típicamente diluidos. Como resultado, cuando se forman los azeótropos de punto de ebullición máximo, la cantidad de energía requerida para hervir y retirar el exceso de agua no combinada representa una carga de calor grande y puede hacer, con frecuencia, que los procesos de vaporización y condensación de la destilación sean costosos. Asimismo, el azeótropo de punto de ebullición máximo aparece a temperaturas que superan los puntos de ebullición de las especies puras, lo que eleva las temperaturas de fondo en un sistema de destilación. En consecuencia, el producto del fondo en el punto de ebullición máximo experimenta un cuadro de calor superior que las especies puras. Este cuadro de calor de alta temperatura puede degradar el valor del producto principal y los coproductos de fermentación. Los granos secos con solubles de destilería (DDGS) – que típicamente se utilizan como ingrediente alimenticio– son un ejemplo de dicho coproducto que puede ser degradado con la exposición al alto calor y perder su valor nutricional.

Los azeótropos de punto de ebullición mínimo también son conocidos como azeótropos positivos ya que el azeótropo tiene un coeficiente de actividad superior a 1. Los azeótropos de punto de ebullición máximo también son conocidos como azeótropos negativos porque su coeficiente de actividad es inferior a 1. La magnitud del coeficiente de actividad dicta el grado de actividad no ideal de la entidad

azeotrópica. Este estado no ideal y la dificultad en la separación de los azeótropos han sido estudiados. El coeficiente de actividad no es fijo pero es una función de la concentración del compuesto en el agua. Como resultado, el punto de ebullición de la solución de la composición azeotrópica varía a medida que varía la concentración del componente. Como resultado, la composición azeotrópica desarrollada en la fase de vapor puede ser afectada por la concentración del componente y la presión de operación.

De acuerdo con una forma de realización preferente, una solución acuosa del alcohol C3-C6 forma un azeótropo de punto de ebullición mínimo. De acuerdo con una forma de realización preferente relacionada, la concentración del alcohol C3-C6 en el vapor mixto es sustancialmente igual a la concentración del alcohol en el azeótropo de punto de ebullición mínimo a la presión seleccionada para la destilación. En algunas formas de realización particularmente preferentes, la concentración del alcohol C3-C6 en el vapor mixto es superior a la concentración del alcohol en el azeótropo de punto de ebullición mínimo, como en algunos casos en los que la solución acuosa comprende otros solutos además del alcohol que afectan la presión de vapor parcial del agua.

Algunos azeótropos son conocidos por ser estables bajo un amplio rango de presiones de operación, mientras que otros sistemas azeotrópicos se pueden "quebrar" a causa de la presión baja y alta. Por ejemplo, el azeótropo de etanol y agua se quiebra a presiones inferiores a 70 torr. Para los azeótropos que pueden ser quebrados bajo vacío, el uso de columnas de destilación se limita a menudo por el hecho de que las columnas de destilación al vacío requieren que la caída de la presión en la columna de destilación sea lo suficientemente significativa como para

requerir que se extraiga mayor vacío en la fuente de vacío. Por ejemplo, intentar mantener la presión de alimentación de la columna de destilación al vacío a 150 mm Hg requiere que la caída de la presión en la columna sea muy pequeña a fin de asegurar que la bomba de vacío pueda mantener niveles de vacío apropiados. Alcanzar una caída baja de la presión en las columnas de vacío con múltiples bandejas requiere pequeñas alturas del líquido en las bandejas de destilación. La caída baja de la presión y la altura baja del líquido en la columna típicamente incrementa los costos de capital de la columna al incrementar el diámetro de la columna.

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende diálisis. La diálisis funciona según el principio de difusión de solutos y ultrafiltración del fluido a través de una membrana semi-permeable. Cualquier sistema de separación de membrana que extrae en forma selectiva el agua de la solución acuosa es adecuado para el proceso de la presente invención. De acuerdo con una forma de realización preferente, la diálisis se realiza en un sistema que comprende dos o más compartimientos. La solución acuosa del alcohol se introduce en uno y el agua de esta solución se transfiere en forma selectiva a través de la membrana en el otro. De acuerdo con una forma de realización preferente, la transferencia del agua es inducida por presión osmótica. El compartimiento que recibe el agua contiene un compuesto hidrófilo, por ej. CaCl_2 o un carbohidrato, o una solución concentrada de dicho compuesto. Una solución concentrada se forma en el compartimiento que recibe el agua. Esa solución se trata de acuerdo con varias formas de realización para regenerar el soluto o su solución concentrada, o para otras aplicaciones. La regeneración se puede efectuar a través de medios conocidos, tales como destilación del agua. En el caso en que el soluto

es un carbohidrato u otra fuente de carbono fermentable, la solución se puede usar para proveer fermentables al paso de fermentación.

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende osmosis inversa. En la osmosis inversa, se pone en contacto la solución acuosa en un primer compartimiento con una membrana para osmosis inversa bajo presión, por medio de la cual el agua se transfiere en forma selectiva a través de la membrana hasta un segundo compartimiento, mientras que el alcohol es retenido en el primer compartimiento. Como resultado de la transferencia selectiva del agua en el segundo compartimiento, la concentración (y actividad) del alcohol en el líquido del primer compartimiento se incrementa y preferentemente alcanza la saturación, por lo cual se forma una segunda fase en ese primer compartimiento. Ese compartimiento comprende, de acuerdo con esta forma de realización, dos fases líquidas, una de las cuales es una fase acuosa saturada en alcohol y la otra es una solución de alcohol saturada en agua.

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende extracción por solvente. En la extracción por solvente, se pone en contacto la solución acuosa con otra fase líquida (solvente o extractor), en donde al menos uno entre el agua y el alcohol no son completamente miscibles. Las dos fases se mezclan y luego se dejan reposar. De acuerdo con una forma de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende extracción del alcohol C3-C6 en un extractor selectivo de alcohol. La expresión "extractor selectivo de alcohol" se refiere a un extractor que prefiere alcohol por sobre el agua de manera tal que la relación alcohol/agua en el extractor es mayor que en la solución acuosa remanente. Por ende, el solvente o extractor selectivo de

alcohol selecciona al alcohol (en similar medida o más hidrófobo que el alcohol) y el alcohol se transfiere con preferencia en el extractor o solvente para formar el extractor o solvente que contiene alcohol, también denominado "extracto". En algunas formas de realización preferentes, el solvente selectivo de alcohol puede ser butil acetato, tributilfosfato, decanol, 2-heptanona u octano. En otra forma de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende extracción de agua en un extractor selectivo de agua. La expresión "extractor selectivo de agua" se refiere a un extractor que prefiere el agua por sobre el alcohol de manera tal que la relación alcohol/agua en el extractor es menor que en la solución acuosa remanente. Por ende, el solvente o extractor selectivo de agua selecciona al agua (más hidrófilo que el alcohol), de manera tal que el agua se transfiere con preferencia en el solvente o extractor selectivo de agua.

En una forma de realización preferente, el solvente selectivo de alcohol puede ser un extractor ácido basado en amina. Dicho extractor se puede preparar al mezclar una amina con un diluyente y poner en contacto la mezcla con un ácido. Las aminas que son adecuadas para formar el extractor incluyen aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, con preferencia aminas primarias, secundarias y terciarias. Las aminas adecuadas también son insolubles en agua tanto en forma libre como en forma de sal (es decir, cuando un ácido se une a ellas). Preferentemente, el número agregado/total de átomos de carbono en las aminas es al menos de 20. Tanto las aminas alifáticas como las aromáticas son adecuadas, y las aminas alifáticas son las preferidas. El diluyente puede ser un hidrocarburo u otro solvente orgánico no reactivo con un punto de ebullición de al menos alrededor de 60 °C, y preferentemente al menos de alrededor de 80 °C. El ácido puede ser cualquier ácido fuerte, tal como uno con una pKa (constante de disociación $-\log$) no

superior a 3, y puede ser ya sea un ácido mineral o bien un ácido orgánico. En un ejemplo, la amina puede ser trioctil amina, el ácido puede ser ácido sulfúrico y el diluyente puede ser decano. El ácido es extraído (se une a la amina) para formar el extractor.

En algunas formas de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende la adsorción del alcohol C3-C6 o del agua sobre un adsorbente selectivo. En la adsorción, se pone en contacto la solución acuosa con un adsorbente selectivo que tiene mayor selectividad ya sea para el alcohol o para el agua. En una forma de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende la adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo de alcohol. Un "adsorbente selectivo de alcohol" hace referencia a un adsorbente que prefiere al alcohol por sobre el agua de manera tal que la relación alcohol/agua en el adsorbente es mayor que en la solución acuosa remanente. En otra forma de realización, el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende la adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo de agua. Un "adsorbente selectivo de agua" hace referencia a un adsorbente que prefiere al agua por sobre el alcohol de manera tal que la relación alcohol/agua en el adsorbente es menor que en la solución acuosa remanente. Por consiguiente, se pone en contacto la fase acuosa con un adsorbente selectivo de agua, se forma un adsorbente portador de agua y la solución acuosa se enriquece en alcohol C3-C6. De acuerdo con varias formas de realización, el adsorbente de agua es hidrófilo, tiene funciones de superficie capaces de formar enlaces de hidrógeno y/o tiene poros adecuados en tamaño al tamaño de las moléculas de agua. En algunas formas de realización, el adsorbente puede ser sólido. De acuerdo con una forma de realización preferente, una carga de alimentación para fermentación, tal como maíz triturado, puede ser el adsorbente.

Por ejemplo, se puede poner en contacto la carga de alimentación con la solución acuosa para adsorber en forma selectiva el agua fuera de la misma. En algunas formas de realización el adsorbente puede ser un tamiz molecular.

El método incluye, además, el paso de formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la porción de la solución acuosa que ha sido tratada para incrementar la actividad del alcohol C3-C6. Tal como se usa en la presente, la expresión "fase líquida rica en alcohol" hace referencia a una fase líquida en donde la relación del alcohol con respecto al agua es superior a aquélla en la porción de la solución acuosa. La expresión "fase líquida rica en agua" hace referencia a una fase líquida en donde la relación del agua con respecto al alcohol es superior a aquélla de la fase líquida rica en alcohol. La fase rica en agua también se denominará en lo sucesivo "fase deficiente en alcohol". El paso de formar las dos fases puede ser activo. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el paso de formación puede comprender condensar una fase de vapor destilado que forma dos fases después de la condensación. En forma adicional alternativa, congelar o enfriar la porción tratada de la solución acuosa puede generar la formación de las dos fases. Otros pasos para formar de manera activa las dos fases puede incluir la utilización de equipos modelados para promover la separación de fases. La separación de las fases se puede alcanzar en varias operaciones unitarias que incluyen separadores líquido-líquido que comprenden un separador líquido-líquido que utiliza diferencias de gravedad específicas entre las fases y una bota de agua, separación por fuerza G como en una centrifuga, o separadores líquido-líquido centrífugos. También son adecuados los decantadores como en las unidades de mezcla y decantación usadas para los procesos de extracción por solvente. En algunas formas de realización, el paso de formación es pasivo y puede simplemente

ser una consecuencia natural del paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 hasta al menos la de saturación, que se realizó en forma anterior.

En la fase líquida rica en alcohol, la relación de la concentración del alcohol C3-C6 con respecto al agua es efectivamente mayor que en la porción de inicio. En la fase rica en agua, la relación de concentración del alcohol C3-C6 con respecto al agua es efectivamente menor que en la fase líquida rica en alcohol. La fase rica en agua también puede denominarse "fase pobre en alcohol".

En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es propanol y la relación en peso del propanol con respecto al agua en la fase rica en alcohol es superior a alrededor de 0,2, superior a alrededor de 0,5, o superior a alrededor de 1. En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es butanol y la relación del butanol con respecto al agua en la fase rica en alcohol es superior a alrededor de 1, superior a alrededor de 2, o superior a alrededor de 8. En algunas formas de realización, el alcohol C3-C6 es pentanol y la relación del pentanol con respecto al agua en la fase rica en alcohol es superior a alrededor de 4, superior a alrededor de 6, o superior a alrededor de 10.

El factor de concentración o el factor de enriquecimiento para una determinada fase se puede expresar como la relación del alcohol con respecto al agua en esa fase dividida por la relación del alcohol con respecto al agua en la solución acuosa diluida. Por consiguiente, por ejemplo, el factor de concentración o enriquecimiento para la fase rica en alcohol se puede expresar como la relación de alcohol/agua en la fase rica en alcohol dividida por esa relación en la solución acuosa diluida.

En algunas formas de realización, la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación en al menos alrededor de 5 veces, al menos alrededor de 25 veces, al menos alrededor de 50 veces, al menos alrededor de 100 veces, o al menos alrededor de 300 veces.

El proceso incluye, además, separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua. Separar las dos fases se refiere a la separación física de las dos fases y puede incluir extracción, depuración, vertido, decantación o transferencia de una fase a otra y se puede lograr a través de cualquier medio conocido en el arte de la separación de las fases líquidas.

En algunas formas de realización, el método comprende, además, el paso de enfriar la fase rica en alcohol C3-C6 para incrementar la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol.

En algunas formas de realización, el método comprende, además, recuperar el alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol. "Recuperar" se refiere a aislar el alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol. "Recuperar" también incluye enriquecer o incrementar la concentración del alcohol C3-C6 en la fase rica en alcohol. En varias formas de realización, este paso puede comprender un proceso seleccionado del grupo conformado por destilación, diálisis, adsorción de agua (por ej., tal como el uso de tamices moleculares), extracción por solvente, contacto con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua y contacto con un compuesto hidrófilo para producir una primera fase que comprende el alcohol C3-C6 y el agua y una segunda fase que comprende el alcohol C3-C6, en donde la relación del agua con respecto al alcohol C3-C6 en la segunda fase es menor que en la primera fase. En formas de

realización preferentes, la segunda fase comprende al menos alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, alrededor del 95% o alrededor del 99% en peso de alcohol C3-C6. Tal como se utiliza en la presente, un "líquido que es inmiscible en agua" tiene una miscibilidad en agua menor a alrededor de 1% en peso.

Los métodos de destilación y diálisis se analizaron con anterioridad respecto del paso de incrementar la actividad de los alcoholes C3-C6 y pueden usarse procesos similares para recuperar el alcohol C3-C6 de una fase rica en alcohol C3-C6. Con relación al uso de adsorción del agua para recuperar el alcohol C3-C6 de una fase rica en alcohol C3-C6, se pone en contacto la fase rica en alcohol con un adsorbente que adsorbe en forma selectiva el agua fuera de la fase rica en alcohol. Se forma un adsorbente portador de agua y la fase rica en alcohol se enriquece adicionalmente en el alcohol C3-C6. De acuerdo con varias formas de realización, el adsorbente de agua es hidrófilo, tiene funciones de superficie capaces de formar enlaces de hidrógeno y/o tiene poros adecuados en tamaño al tamaño de las moléculas de agua. En algunas formas de realización, el adsorbente puede ser sólido. De acuerdo con una forma de realización preferente, una carga de alimentación para fermentación, tal como maíz triturado, puede ser el adsorbente. Por ejemplo, la carga de alimentación puede entrar en contacto con la fase rica en alcohol C3-C6 para adsorber en forma selectiva el agua fuera de la misma. En algunas formas de realización, el adsorbente puede ser un tamiz molecular.

La extracción por solvente también se puede usar para recuperar alcohol C3-C6 de una fase rica en alcohol C3-C6. En la extracción por solvente, se pone en contacto la fase rica en alcohol con otra fase líquida (solvente), en donde al menos

uno entre el agua y el alcohol no son completamente miscibles. Las dos fases se mezclan y luego se dejan reposar. De acuerdo con una forma de realización, el solvente es selectivo del agua (más hidrófilo que el alcohol), el agua se transfiere preferentemente a la fase de solvente y la relación del alcohol con respecto al agua en la otra fase se incrementa. De acuerdo con otra forma de realización, el solvente es selectivo para el alcohol (en grado similar o más hidrófobo que el alcohol). En algunas formas de realización preferentes, el solvente selectivo de alcohol puede ser butilacetato, tributilfosfato, decanol, 2-heptanona u octano. El alcohol se transfiere preferentemente en el solvente. En un paso posterior, el alcohol se separa del solvente en una forma que tiene una relación en la cual el agua es superior al alcohol en comparación con la de la fase rica en alcohol.

El contacto con un líquido hidrocarburo que es inmisible en agua también se puede usar para recuperar alcohol C3-C6 de una fase rica en alcohol C3-C6. Dichos líquidos son solventes hidrófobos y actúan tal como describió con anterioridad para los solventes hidrófobos, es decir, extrayendo el alcohol de la fase rica en alcohol. Los ejemplos de dichos hidrocarburos líquidos incluyen gasolina, petróleo crudo, materiales Fischer Tropsch y biocombustibles.

El contacto con un compuesto hidrófilo también se puede usar para recuperar alcohol C3-C6 de una fase rica en alcohol C3-C6. Este método de recuperación es similar al descrito con anterioridad para el uso de un compuesto hidrófilo a fin de incrementar la actividad del alcohol o reducir la actividad del agua.

En el caso de la destilación para recuperar alcohol C3-C6 de una fase rica en alcohol C3-C6, la primera fase comprende una fase de vapor que comprende alcohol

C3-C6 y agua y la segunda fase comprende un producto de alta ebullición que comprende alcohol C3-C6.

En otra forma de realización de la presente invención, el proceso puede incluir, después del paso de incrementar la actividad, conducir (o transportar) la porción restante de la solución acuosa diluida, tal como un caldo de fermentación, hasta un recipiente de fermentación. En esta forma de realización, la porción restante de la solución acuosa diluida puede comprender una impureza y el proceso incluye, además, extraer al menos una porción de la impureza de al menos una porción de la porción restante antes de conducir la porción restante hasta el recipiente de fermentación. Dichas impurezas pueden ser, por ejemplo, etanol, acetato, aldehídos tales como butiraldehído, y ácidos grasos de cadena corta. En algunas formas de realización, la solución acuosa diluida puede incluir una impureza y la relación de la impureza respecto del alcohol C3-C6 en la fase líquida rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación en la fase rica en agua. En algunas formas de realización, la relación de la impureza con respecto al alcohol C3-C6 en la fase líquida rica en agua es superior a la relación en la fase rica en alcohol.

En otras formas de realización de la invención, la fase rica en alcohol C3-C6 se procesa adicionalmente para incrementar el valor o la utilidad de la fase. Otras formas de realización de procesamiento adicional se revelan en la solicitud de patente estadounidense N° 12/327.723, presentada el 3 de diciembre de 2008, que se incorpora por referencia en su totalidad. Por ejemplo, la fase rica en alcohol C3-C6 puede ser procesada adicionalmente al (i) destilar el alcohol C3-C6 sustancialmente puro de la fase rica en alcohol C3-C6, (ii) destilar un azeótropo del alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol C3-C6, (iii) poner en contacto la fase rica en

alcohol C3-C6 con un adsorbente selectivo de alcohol C3-C6; o (v) combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua. En el caso de destilar el alcohol C3-C6 sustancialmente puro de la fase rica en alcohol C3-C6, el alcohol C3-C6 sustancialmente puro puede tener una baja proporción de impurezas (tal como la reflejada al tener una baja relación de impurezas con respecto al alcohol C3-C6). Por ejemplo, la relación de impurezas con respecto al alcohol C3-C6, en el alcohol C3-C6 sustancialmente puro, puede ser inferior a alrededor de 5/95, inferior a alrededor de 2/98, o inferior a alrededor de 1/99. En forma alternativa, el alcohol C3-C6 sustancialmente puro puede tener un contenido de agua inferior a alrededor del 5 % en peso, inferior a alrededor del 1 % en peso o inferior a alrededor del 0,5 % en peso.

En el caso de combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua, la combinación resultante puede formar una única fase uniforme. En forma alternativa, en el caso de combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua, la combinación puede formar una fase liviana y una fase pesada y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase liviana es mayor que en la fase pesada. De acuerdo con una forma de realización del método, el líquido hidrocarburo es un combustible, tal como gasolina. De acuerdo con una forma de realización relacionada, un combustible enriquecido en alcohol C3-C6 se forma al combinar un combustible con una fase rica en alcohol C3-C6, que además comprende agua. Como resultado de la combinación, el alcohol C3-C6 se transfiere en forma selectiva en la fase de combustible para formar dicho combustible enriquecido, mientras que la mayor parte del agua contenida inicialmente en la fase

rica en alcohol se separa como una fase pesada rica en agua, que es separada del combustible.

En otras formas de realización de la invención, en las cuales la solución acuosa diluida es un medio de fermentación, el proceso puede incluir un paso de cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6 antes de los pasos de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del medio de fermentación, formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase rica en agua y separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua. En una forma de realización preferente, la invención incluye, además, el paso de conducir la fase rica en agua hasta el medio de fermentación antes del paso de incrementar la actividad del alcohol. En dichas formas de realización, el paso de cultivo puede ser un proceso seleccionado entre: una fermentación por lote, una fermentación por lote alimentado, una fermentación continua, una fermentación con reciclado celular y un proceso de reacción enzimática.

Tal como se indicó con anterioridad, se analizan en detalle un biocatalizador adecuado y los procesos de fermentación relacionados en las solicitudes de patentes estadounidenses N° 12/263.436 y 12/263.442, presentadas el 31 de octubre de 2008, la solicitud de patente provisional estadounidense N° 61/110.543, presentada el 31 de octubre de 2008 y la solicitud de patente provisional estadounidense N° 61/121.830, presentada el 11 de diciembre de 2008. Los microorganismos adecuados se pueden seleccionar entre microorganismos de la naturaleza, microorganismos genéticamente manipulados y microorganismos obtenidos mediante técnicas clásicas, o una combinación de los mismos. Dichos microorganismos pueden incluir, sin limitaciones, bacterias y hongos (inclusive

levadura). Por ejemplo, las bacterias adecuadas pueden incluir aquéllas capaces de producir alcohol tales como las bacterias de la especie *Clostridium*. Los ejemplos de estas bacterias incluyen, sin limitaciones: *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutlicum*, *Clostridium saccharoperbutilacetonicum*, *Clostridium saccharobutlicum* y *Clostridium beijerickii*.

Las bacterias y los hongos adecuados también incluyen los que son capaces de hidrolizar carbohidratos y pueden manipularse genéticamente para producir alcoholes. Los ejemplos incluyen, sin limitaciones: las bacterias del orden *Clostridiales* (por ej. *Butyrovibrio fibrissolvens*), *Bacilliales* (por ej. *Bacillus circulans*), *Actinomycetales* (por ej. *Streptomyces cellulolyticus*), *Fibrobacterales* (por ej. *Fibrobacter succinogenes*), *Xanthomonadales* (especie *Xanthomonas*) y *Pseudomonadales* (por ej. *Pseudomonas mendocina*) y los hongos tales como los del orden *Rhizopus*, *Saccharomycopsis*, *Aspergillus*, *Schwanniomyces* y *Polysporus*. Los hongos pueden realizar la conversión en forma aeróbica o anaeróbica. Los ejemplos de hongos anaeróbicos incluyen, sin limitaciones: la especie *Piromyces* (por ej. cepa E2), la especie *Orpinomyces* (por ej. *Orpinomyces bovis*), la especie *Neocallimastix* (*N. frontalis*), la especie *Caecomyces*, la especie *Anaeromyces* y la especie *Ruminomyces*. Tal como se indicó con anterioridad, cualquier microorganismo –ya sea natural o creado por el hombre– que sea capaz de producir alcohol puede ser utilizado, y los métodos de la presente invención no se limitan a los ejemplos listados en esta descripción. En algunas formas de realización, el microorganismo es viable a temperaturas que abarcan desde alrededor de 20 °C hasta alrededor de 95 °C. Cuando se hace referencia a que un microorganismo es viable a una determinada temperatura o rango de temperaturas, significa que un microorganismo es capaz de sobrevivir a la exposición a dichas temperaturas y,

posteriormente, es capaz de desarrollarse y/o producir productos metabólicos bajo condiciones iguales o diferentes. En otras formas de realización, el microorganismo es un microorganismo resistente a la temperatura. El término "resistencia" tal como se define en la presente, hace referencia a la propiedad de un biocatalizador de tener un bajo índice de inhibición en presencia de concentraciones crecientes de un inhibidor en el caldo de fermentación. La expresión "más resistente" describe un biocatalizador que tiene un índice menor de inhibición hacia un inhibidor que otro biocatalizador con un índice superior de inhibición hacia el mismo inhibidor. Por ejemplo, dos biocatalizadores A y B, ambos con una tolerancia del 2% a un precursor de biocombustible inhibidor y una productividad específica de 1 g de producto por g de CDW por hora, exhiben al 3% del precursor de biocombustible una productividad específica de 0,5 g de producto por g de CDW por hora y 0,75 g de producto por g de CDW por hora para A y B, respectivamente. El biocatalizador B es más resistente que el A. La expresión "resistente a la temperatura" describe un biocatalizador que tiene un índice inferior de inhibición a una determinada temperatura que otro biocatalizador con un índice superior de inhibición a la misma temperatura.

El término "tolerancia" se define como la habilidad del biocatalizador de mantener su productividad específica a una determinada concentración de un inhibidor. El término "tolerante" describe un biocatalizador que mantiene su productividad específica a una determinada concentración de un inhibidor. Por ejemplo, si en presencia del 2% de un inhibidor, un biocatalizador mantiene la productividad específica que tenía del 0 al 2%, el biocatalizador es tolerante al 2% del inhibidor o tiene una tolerancia al 2% del inhibidor. La expresión "tolerancia a la

temperatura" se define como la habilidad del biocatalizador de mantener su productividad específica a una determinada temperatura.

En algunas formas de realización, el microorganismo tiene una productividad de al menos alrededor de 0,5 g/L por hora del alcohol C3-C6 en agregado en toda la duración de un ciclo de fermentación por lote. En algunas formas de realización, la productividad es de al menos alrededor de 1, al menos alrededor de 1,5, al menos alrededor de 2,0, al menos alrededor de 2,5, al menos alrededor de 3, al menos alrededor de 3,5, al menos alrededor de 4,0, al menos alrededor de 4,5, y al menos alrededor de 5,0 g/L por hora del alcohol C3-C6 en agregado en toda la duración de un ciclo de fermentación por lote. En algunas formas de realización, la productividad abarca desde alrededor de 0,5 g/L por hora hasta alrededor de 5 g/L por hora del alcohol C3-C6 en toda la duración de un ciclo de fermentación por lote.

En otras formas de realización, los microorganismos preferentes son los que producen el alcohol deseados sin coproductos o subproductos, o con coproductos o subproductos mínimos. También se prefieren los microorganismos que usan medios de fermentación sencillos y de bajo costo.

Cualquier carga de alimentación que contiene una fuente de carbono fermentable es adecuada para las formas de realización de la presente invención, que incluyen un paso de cultivar un microorganismo. Los ejemplos incluyen cargas de alimentación que contienen polisacáridos, tales como almidón, celulosa y hemicelulosa; cargas de alimentación que contienen disacáridos, tales como sucrosa, jugo de caña de azúcar y melazas que contienen sucrosa; y monosacáridos, tales como glucosa y fructosa. Las cargas de alimentación adecuadas incluyen cultivos almidonosos, tales como maíz y trigo, caña de azúcar y

remolacha azucarera, melazas y material lignocelulósico. Las cargas de alimentación adecuadas también incluyen algas y microalgas. Cuando sea deseable, la carga de alimentación puede someterse a tratamientos tales como trituración; molienda; separación de la fuente de carbono de otros componentes, tales como proteínas; descristalización; gelatinización; licuefacción; sacarificación; es hidrólisis catalizada mediante catalizadores químicos y/o enzimáticos. Dicho tratamiento se puede realizar antes de la fermentación o de manera simultánea con la misma, por ejemplo, en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación.

El caldo de fermentación de la presente invención tiene típicamente una única fase líquida, pero no es necesariamente homogéneo ya que puede contener sólidos insolubles no fermentados, por ej., en forma suspendida. La carga de alimentación para fermentación puede contener compuestos de solubilidad en agua limitada y, opcionalmente, de fermentabilidad limitada, o nula. Por ejemplo, de acuerdo con una forma de realización de la invención, la carga de alimentación para fermentación es maíz triturado y la fuente de carbono es el almidón contenido en el mismo. Posiblemente, el almidón está gelatinizado, licuado y/o sacarificado, pero los componentes insolubles –ya sea almidonosos u otros, por ej. proteína no fermentada– puede existir aún en el líquido de fermentación. De acuerdo con otra forma de realización, la carga de alimentación para fermentación es un material lignocelulósico y la fuente de carbono es celulosa y/o hemicelulosa hidrolizada. Nuevamente, aquí, parte de los componentes de la carga de alimentación tienen solubilidad en agua limitada. En estos y otros casos, el líquido de fermentación puede constar de una solución acuosa del alcohol con sólidos suspendidos en el mismo. Aún así, de acuerdo con un aspecto importante de la invención, en todos esos casos, existe solamente una única fase líquida en el caldo de fermentación.

Otra forma de realización de la invención es un método para producir un alcohol C3-C6 que incluye hidrolizar una carga de alimentación que comprende un polisacárido y al menos otro compuesto para producir productos de hidrólisis fermentables, una porción de los cuales se fermentan en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6. En esta forma de realización, el medio de fermentación comprende, además, al menos un compuesto no fermentado. El método comprende, además, incrementar la actividad del alcohol C3-C6 de una porción del medio de fermentación, formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase rica en agua, y separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua, tal como se describió en las formas de realización anteriores de la invención. Este método incluye, además, separar dicho al menos un compuesto no fermentado del medio de fermentación, la fase rica en agua o ambos. Por ejemplo, dicho al menos un compuesto no fermentado puede incluir un material tal como DDGS.

En varias formas de realización de la invención que incluyen fermentación, el paso de fermentación se puede realizar de manera simultánea con otros pasos de proceso tales como los varios métodos de recuperación revelados en la presente, que incluyen los pasos de incrementar la actividad de un alcohol C3-C6 y también los pasos de hidrolizar cargas de alimentación para prepara un sustrato de fermentación.

En este método, el paso de hidrolización puede incluir cualquier método capaz de desintegrar los carbohidratos poliméricos en productos fermentables. Por consiguiente, el paso de hidrolización puede ser hidrólisis catalizada a nivel químico o enzimático o autohidrólisis, y sacarificación. En este método, los pasos de hidrolización y fermentación se pueden efectuar de manera simultánea durante al

menos un lapso de tiempo del método, se pueden realizar de manera simultánea durante todo el tiempo que dura el método, o se pueden efectuar en distintos momentos.

En una forma de realización particular de este método, el paso de fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de hidrolizar la carga de alimentación. Los microorganismos adecuados se pueden seleccionar entre microorganismos de ocurrencia natural, microorganismos genéticamente manipulados y microorganismos desarrollados mediante técnicas clásicas, o una combinación de los mismos, y han sido analizados en detalle con anterioridad en la presente.

Una forma de realización alternativa de la presente invención es un método para producir un alcohol C3-C6 que incluye cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6. El paso de cultivar se describió en detalle con anterioridad en la presente. El método incluye, además, incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del medio de fermentación y destilar la porción del medio de fermentación para producir una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 y una fase líquida. Los pasos de incremento de la actividad y destilación se analizaron en los párrafos anteriores respecto de otras formas de realización de la presente invención. El método incluye, además, conducir la fase líquida generada del paso de destilación (la fase líquida agotada) hasta el medio de fermentación. En una forma de realización preferente, la porción del medio de fermentación en la cual la actividad del alcohol C3-C6 se incrementa comprende microorganismos que permanecen en la fase líquida agotada y se devuelven al medio de fermentación para la producción adicional del alcohol C3-C6 por parte del

microorganismo. En algunas formas de realización, la fase líquida comprende una impureza y el método incluye, además, extraer al menos una porción de la impureza de al menos una porción de la fase líquida antes del paso de conducir la fase líquida hasta el medio de fermentación. En las formas de realización de este método, la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la porción del medio de fermentación es inferior a alrededor de 10/90 (p/p), inferior a alrededor de 7,5/92,5 (p/p), inferior a alrededor de 5,0/95(p/p), inferior a alrededor de 2,5/97,5 (p/p), inferior a alrededor de 2/98 (p/p), inferior a alrededor de 1,5/98,5 (p/p), inferior a alrededor de 1/99 (p/p), o inferior a alrededor de 0,5/99,5 (p/p).

Otra forma de realización alternativa de la presente invención es un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa diluida que comprende los pasos de destilar una porción de la solución acuosa diluida a una fase de vapor que comprende alcohol C3-C6 y agua, y condensar la fase de vapor.

En esta forma de realización, la fase de vapor comprende entre alrededor del 1% en peso y alrededor del 45% en peso del alcohol C3-C6 que está presente en la porción de la solución acuosa diluida. Mientras sea posible destilar más del 45% del alcohol C3-C6 de la porción de la solución acuosa diluida en la fase de vapor, al controlar o limitar la cantidad de alcohol en la solución que es destilada a la fase de vapor (es decir, dejando atrás una cantidad significativa de alcohol), se alcanza un gran número de ventajas importantes. A medida que una porción mayor del alcohol en la solución es destilada, la cantidad de agua con relación a la cantidad de alcohol se incrementa, lo que provoca la necesidad de manejar una carga de agua incrementada corriente abajo que puede generar mayores requerimientos de energía. Asimismo, por ejemplo, en el contexto de una fermentación, la porción no

destilada de la solución puede devolverse al recipiente de fermentación y usarse como parte del medio de fermentación para la producción de alcohol adicional que se puede recuperar en un proceso similar. Este proceso, entonces, es altamente eficiente porque permite la recuperación de alcohol en el paso de destilación en un rango en el cual la cantidad relativa de alcohol con respecto al agua es alta. En varias formas de realización alternativas, la fase de vapor puede comprender entre alrededor del 2% en peso y alrededor del 40% en peso del alcohol C3-C6, entre alrededor del 3% en peso y alrededor del 35% en peso del alcohol C3-C6 y entre alrededor del 4% en peso y alrededor del 30% en peso del alcohol C3-C6 y entre alrededor del 5% en peso y alrededor del 25% en peso del alcohol C3-C6 presente en la porción de la solución acuosa diluida.

En algunas formas de realización, el paso de destilación comprende una destilación de una sola etapa. La destilación de una sola etapa puede tener lugar en un tanque flash. El diseño del tanque flash ha sido descrito en detalle en los párrafos anteriores.

En algunas formas de realización, la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la solución acuosa diluida es inferior a alrededor de 10/90 (p/p). En algunas formas de realización preferidas, la relación es inferior a alrededor de 7,5/92,5 (p/p), inferior a alrededor de 5,0/95(p/p), inferior a alrededor de 2,5/97,5 (p/p), inferior a alrededor de 2/98 (p/p), inferior a alrededor de 1,5/98,5 (p/p), inferior a alrededor de 1/99 (p/p), o inferior a alrededor de 0,5/99,5 (p/p).

El paso de destilación puede ser destilación adiabática o isotérmica. En la destilación adiabática, no se produce una transferencia significativa de calor entre el sistema de destilación y el entorno, y la presión del sistema se mantiene constante.

En la destilación isotérmica, se permite la transferencia de calor entre el sistema de destilación y el entorno, y la temperatura del sistema se mantiene constante.

En varias formas de realización de este método, el enriquecimiento del alcohol a partir de la solución acuosa diluida al vapor es al menos de alrededor de 5 veces, alrededor de 6 veces, alrededor de 7 veces, alrededor de 8 veces, alrededor de 9 veces, alrededor de 10 veces, alrededor de 11 veces, alrededor de 12 veces, alrededor de 13 veces, alrededor de 14 veces o alrededor de 15 veces. El término "enriquecimiento" se refiere a la relación de alcohol/agua en el vapor condensado dividida por la relación de alcohol/agua en la solución acuosa diluida.

En algunas formas de realización, el método comprende, además, el paso de formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la porción de la solución acuosa diluida. En algunas formas de realización, el método comprende, además, separar la fase rica en alcohol C3-C6 y la fase rica en agua. Los pasos de formar una fase líquida rica en alcohol y una fase líquida rica en agua, y de separar las dos ha sido analizado en detalle con anterioridad.

Otra forma de realización alternativa de la presente invención es un método para producir un producto a partir de un alcohol C3-C6 en una solución acuosa diluida, tal como un caldo de fermentación que comprende microorganismos y el alcohol C3-C6. Este método incluye destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 a partir de la solución acuosa diluida y hacer reaccionar el alcohol C3-C6 en la fase de vapor para formar el producto. Esta forma de realización comprende, además, otros pasos de proceso revelados en la presente, que generan la formación de la fase de vapor.

Una forma de realización de la presente invención se ilustra en la Figura 1. La fermentación se realiza en un fermentador 10. El caldo de fermentación en el fermentador 10 incluye el producto de alcohol C3-C6, tal como butanol, y otros componentes del medio de fermentación. Durante el transcurso de la fermentación, una corriente del caldo de fermentación, que puede incluir microorganismos, es conducida desde el fermentador 10 hasta un intercambiador de calor 20 vía 12. El intercambiador de calor 20 se usa para elevar la temperatura del caldo de fermentación hasta una temperatura adecuada para una destilación subsiguiente. Después de elevar la temperatura del caldo de fermentación a una temperatura apropiada, el caldo es conducido adicionalmente a un tanque flash 30 para destilación vía 22. El calor de la fermentación puede suministrar en forma parcial el calor requerido para la vaporización en el sistema de destilación súbita. El tanque flash 30 se mantiene por debajo de la presión atmosférica de manera tal que, ante la introducción del caldo de fermentación calentado en el tanque flash 30, una porción del caldo de fermentación se vaporice. La porción del caldo de fermentación vaporizado incluye solamente una porción del butanol en el caldo de fermentación junto con vapor de agua. Después de la destilación en el tanque flash 30, la porción restante del caldo de fermentación que no está destilada regresa al fermentador 10 vía 34. Este caldo de fermentación que está regresando al fermentador ahora carece parcialmente de butanol. La porción del caldo de fermentación que es vaporizada en el tanque flash 30 se conduce como vapor a un condensador de vapor 40 vía 32, que puede ser enfriado, por ejemplo, mediante agua congelada vía 42. Ante la condensación del butanol y el vapor de agua mezclados, la solución condensada se conduce a un separador de fases 50 vía 44. El vapor remanente que no está condensado se conduce luego adicionalmente a una salida vía 48. Se permite que la

solución condensada en el separador de fases se separe en una fase líquida pesada y una fase líquida liviana. La fase líquida pesada consta principalmente de agua con cierta cantidad de butanol soluble en el agua. La fase liviana consta principalmente de butanol con cierta cantidad de agua soluble. A partir del separador de fases, la fase liviana que contiene butanol se puede recuperar mediante separación de la fase pesada y puede tratarse para purificación adicional. La fase pesada que consta principalmente de agua puede ser conducida para otras aplicaciones o usos en el sistema. Las referencias 13, 35 son bombas para líquido y la 47 es una bomba de vacío.

Con referencia a la Figura 2, se presenta una forma de realización específica de la presente invención, que ilustra la producción de butanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas de maíz pretratado, y destilación azeotrópica de una corriente lateral de butanol. El maíz seco se muele hasta obtener un polvo fino. El maíz molido (triturado) 1, la vinaza delgada 3, el limpiador CIP del fermentador 31, el agua reciclada 43, y el vapor 2 se agregan a un sistema de pretratamiento de almidón de maíz 32 en donde se mezclan y se calientan hasta alrededor de 99 °C. (Un limpiador que limpia en el lugar o CIP (*Clean in Place*) del fermentador es una solución acuosa cáustica que se usa para limpiar e higienizar los fermentadores entre lotes. A menudo se utiliza NaOH pero también se pueden usar otras bases fuertes y otros químicos de higienización. La solución CIP residual contiene sólidos, nutrientes, carbohidratos etc. del fermentador (que se adhieren a las paredes) que pueden volver a introducirse en la etapa inicial del pretratamiento del maíz.) Se agrega la alfa-amilasa 50 al sistema de pretratamiento del almidón de maíz 32 en el cual el tiempo de espera puede ser de alrededor de 1 hora o menos. La enzima glucoamilasa 4 se agrega después de que se enfría la solución a una

temperatura que abarca desde alrededor de 50 °C hasta alrededor de 65 °C. Después de un corto período de sacarificación de alrededor de 5 a 6 horas, la mezcla se enfría a alrededor de 32 °C. La concentración de sólidos en la mezcla a este punto puede ser de alrededor de 361g/kg, con inclusión de los sólidos insolubles y solubles. Las enzimas 4 suficientes para completar la sacarificación en alrededor de 32 horas también se agregan a la mezcla de granos molidos de maíz, que se transfiere al fermentador 5. La fermentación se realiza bajo modo de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, del inglés *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) a 32 °C. Una corriente lateral 6 que contiene alrededor del 4% en peso de butanol se extrae en forma continua del fermentador 5 y un intercambiador de calor 33 del tanque flash se usa para controlar la temperatura de una alimentación 7 del tanque flash a alrededor de 34 °C. El vacío de alrededor de 50 mm de Hg se lleva a un tanque flash 34 y se forma una composición de vapor azeotrópico 11. La composición de vapor azeotrópico de butanol y agua 11 puede ser de alrededor del 54 % en peso butanol y alrededor del 46 % en peso de agua. El vapor azeotrópico 11 es bombeado mediante la bomba de vacío 35 y es alimentado a un proceso de conversión química 13 o a un condensador 12. La fase de vapor condensado 36 se conduce a un separador líquido/líquido 37 donde se somete a separación de fases. La fase de vapor condensado se separa en una fase rica en butanol 37a y una fase rica en agua 37b. La fase rica en butanol 37a tiene una concentración de butanol de alrededor de 680 g/L de butanol. La fase rica en agua 37b tiene una concentración de butanol de alrededor de 86 g/L. La relación de los volúmenes producidos para la capa superior 37a a la capa inferior 37b es de 3 a 1.

Los componentes no vaporizados 9 en el tanque flash 34 que incluyen células, agua, nutrientes, carbohidratos, y alrededor del 2 % en peso de butanol no

vaporizado se devuelven al fermentador 5. Los componentes no vaporizados 9 carecen de butanol y, cuando regresan al fermentador 5, pueden continuar produciendo butanol a ser recuperado mediante el tratamiento de la corriente lateral 6 tal como se describió en párrafos anteriores.

La fase pesada rica en agua 37b proveniente del separador líquido/líquido 37 es conducida 15 a un alambique 38 y destilada. Una composición azeotrópica de butanol y agua 18 es generada en el alambique 38 y conducida a un condensador 39 para ser condensada. El vapor condensado 19 es conducido a un separador líquido/líquido 40 para ser separado en una fase pesada rica en agua 40b y una fase liviana rica en butanol 40a. La fase pesada rica en agua 40b que contiene alrededor de 86 g/L de butanol es reciclada 20 nuevamente al alambique 38. La fase rica en butanol 40a tiene una concentración de butanol de alrededor de 680 g/L de butanol.

La fase liviana rica en butanol 40a en el separador líquido/líquido 40 es conducida 21 a un sistema de destilación 41. La fase liviana rica en butanol 37a en el separador líquido/líquido 37 también es conducida 16 al sistema de destilación 41, y puede combinarse con la fase liviana rica en butanol 40a. El sistema de destilación 41 es operado a presión atmosférica y el butanol purificado es producido como un producto de alta ebullición 22 a una concentración de alrededor del 99 % en peso de butanol. (En otras formas de realización, el sistema de destilación puede ser operado a presiones sub-atmosféricas, atmosféricas o supra-atmosféricas.) Un vapor azeotrópico de butanol y agua 23 es producido y enviado al condensador 45 y condensado. El vapor condensado 46 es conducido a un separador líquido/líquido 47 para separarse en una fase pesada rica en agua 47b y una fase liviana rica en butanol 47a. La fase pesada rica en agua 47b es reciclada 48 al alambique 38. La

fase liviana rica en butanol 47a es conducida 51 al sistema de destilación 41 y puede combinarse con otros aportes 16, 21.

La fermentación SSF en el fermentador 5 se efectúa durante 52 horas. El caldo de fermentación que contiene alrededor de 2% de butanol que no se extrae mediante el tanque flash al vacío 34 es conducido 8 al alambique 38. El butanol en el caldo es destilado por el tope como un azeótropo de butanol y agua 18. A partir del alambique 38, se toma agua, carbohidratos no convertidos, nutrientes, células, fibra, germen de maíz, enzimas y otros componentes de fermentación como un producto del fondo 17 y que contiene alrededor del 0,05 % en peso de butanol. La corriente de fondo del alambique 17 es dividida a una secadora de granos secos de destilería 27 y una corriente de purga 28. La vinaza delgada 3 es producida por la corriente de purga 28. Los granos secos de destilería 29 son producidos por la secadora 27. La secadora 27 también produce vapor de agua 30 que es condensado por un condensador 42 y reciclado 43 al sistema de pretratamiento de almidón de maíz 32.

El fermentador 5, el condensador 12 (que tiene un flujo de entrada desde el tanque flash 34), el condensador 39 (que tiene un flujo de entrada desde el alambique 38), y el condensador 45 (que tiene un flujo de entrada desde sistema de destilación 41) tienen corrientes de ventilación 10, 25, 24, 49 que contienen butanol, agua, CO₂, y otros gases inertes. Estas corrientes se combinan en un sistema de recolección de ventilación 44 y se procesan en un equipo corriente abajo 26 para recuperar y purificar el butanol y el CO₂.

La forma de realización anterior de la invención también se puede realizar en una planta de producción de etanol a partir de maíz reestructurada, en la cual las

operaciones primarias –que incluyen el sistema de pretratamiento de almidón de maíz, el fermentador, el alambique, el sistema de destilación y la secadora– son operaciones que se usaron previamente para producir etanol. Dichos sistemas tienen múltiples fermentadores (por lo general, de cinco a siete) que se operan en ciclos de manera tal que cada uno realice una fermentación durante alrededor de 52 horas antes de ser vaciado en un alambique. Las operaciones corriente arriba de los fermentadores (por ej., el sistema de pretratamiento de almidón de maíz) operan esencialmente en forma continua preparando una carga de alimentación para un primer fermentador y luego preparando una carga de alimentación para un segundo fermentador y así sucesivamente. Las operaciones corriente abajo de los fermentadores (por ej., el alambique, el sistema de destilación y la secadora) operan esencialmente en forma continua tomando el caldo de fermentación de cada fermentador a medida que finaliza un ciclo de fermentación para recuperar etanol, producir DDGS, una corriente de purga y vinaza delgada.

Dicha planta de producción de etanol puede ser reestructurada para producir butanol al incorporar varios procesos de producción y recuperación descritos en la presente. Por lo general, los microorganismos que producen etanol son tolerantes a altas concentraciones de etanol en el caldo de fermentación. No obstante, las altas concentraciones de alcoholes C3-C6 en el caldo de fermentación pueden ser tóxicas para los microorganismos. Por ende, se necesita un método de bajo costo para extraer de manera simultánea los alcoholes a medida que se producen para operar una planta de etanol para producir un alcohol C3-C6 en vez de etanol.

Como no pueden generarse concentraciones de butanol tan altas como las concentraciones de etanol antes de que los organismos de producción de butanol se

frenen, los procesos de producción y recuperación descritos en la presente son útiles para incorporarse en una planta de etanol para posibilitar la producción eficiente de butanol. Al incorporar los procesos de recuperación de butanol en los cuales una porción de un caldo de fermentación que puede incluir microorganismos se somete a una operación de recuperación tal como en un tanque flash para la recuperación de una porción del butanol a partir de la porción del caldo de fermentación y se devuelve una corriente carente de butanol a un fermentador, la concentración efectiva de butanol de la fermentación puede incrementarse de manera significativa de manera tal que se pueda efectuar un proceso de producción de butanol en una planta de producción de etanol.

El proceso de reestructurar una planta puede incluir introducir en una planta equipamiento para producir una corriente lateral 6, una alimentación de tanque flash 7, y una corriente de componentes no vaporizados 9, tal como se describió con anterioridad. Asimismo, el equipamiento para realizar las separaciones líquido/líquido tal como los separadores 37, 40, se puede introducir para brindar la recuperación eficiente de butanol.

Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención incluye un método para operar una planta de producción de etanol reestructurada para producir un alcohol C3-C6. En esta forma de realización, la planta de producción de etanol reestructurada comprende una unidad de pretratamiento, múltiples unidades de fermentación, y un alambique para producir el alcohol C3-C6. El método incluye los pasos de pretratar una carga de alimentación para formar azúcares fermentables en la unidad de pretratamiento; fermentar los azúcares fermentables con un microorganismo que produce el alcohol C3-C6 en un medio de fermentación en una

primera unidad de fermentación; tratar una porción del medio de fermentación para extraer el alcohol C3-C6; devolver la porción tratada a la primera unidad de fermentación; y transferir el medio de fermentación desde la primera unidad de fermentación hasta el alambique.

El método incluye el paso de pretratar una carga de alimentación para formar azúcares fermentables en la unidad de pretratamiento. La unidad de pretratamiento recibe en forma continua la carga de alimentación para el pretratamiento. El término "pretratamiento" hace referencia a tratamientos tales como trituración, molienda, separación de la fuente de carbono de otros componentes –tales como proteínas– descristalización, gelatinización, licuefacción, sacarificación e hidrólisis catalizada por medio de catalizadores químicos y/o enzimáticos. Por ejemplo, la carga de alimentación puede ser maíz seco que puede estar triturado, mezclado con agua, calentado y sometido a reacción con amilasas en la unidad de pretratamiento para producir una masa o pasta de granos molidos que contiene azúcares fermentables que son adecuados como sustrato para la fermentación por parte de los microorganismos.

El método incluye, además, el paso de fermentar los azúcares fermentables con un microorganismo que produce el alcohol C3-C6 en un medio de fermentación en una primera unidad de fermentación. Una unidad de fermentación contiene un medio de fermentación que comprende microorganismos que son capaces de convertir los azúcares fermentables en el alcohol C3-C6. Dichos microorganismos han sido descritos en detalle con anterioridad. La planta reestructurada comprende múltiples unidades de fermentación. Una corriente de la carga de alimentación pretratada que contiene azúcares fermentables proveniente de la unidad de

pretratamiento es introducida en la primera unidad de fermentación, donde es combinada con el medio de fermentación que comprende microorganismos. Los microorganismos fermentan los azúcares fermentables presentes para producir el alcohol C3-C6.

El método incluye, además, el paso de tratar una porción del medio de fermentación para extraer el alcohol C3-C6. El medio de fermentación comprende el alcohol C3-C6, el agua, así como también los microorganismos. Se toma una porción (por ej., una corriente lateral) del medio de fermentación de la primera unidad de fermentación para extraer el alcohol C3-C6 contenido en la misma. El tratamiento puede incluir cualquiera entre uno o más de los métodos de purificación y recuperación de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas diluidas tal como se describió en la presente y, en forma específica, puede incluir: destilación de una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6, adición de un soluto hidrófilo, adición de una fuente de carbono soluble en agua, osmosis inversa, y diálisis, y combinaciones de estos pasos, todos los cuales han sido descritos en detalle en los párrafos anteriores. En una forma de realización preferente, este paso comprende dirigir una corriente lateral desde la primera unidad de fermentación hasta un tanque flash en donde el paso de destilación se realiza por debajo de la presión atmosférica. El diseño de un tanque flash ha sido descrito en detalle en los párrafos anteriores.

El método incluye, además, el paso de devolver la porción tratada a la primera unidad de fermentación. La porción tratada carece del alcohol C3-C6 y comprende agua y puede incluir microorganismos, de los cuales ambos regresan al medio de fermentación. Al extraer una porción del alcohol C3-C6 del medio de fermentación y devolver el medio al fermentador, la concentración del alcohol C3-C6 en el caldo

de fermentación se mantiene por debajo de una concentración que es perjudicial para la producción adicional del alcohol C3-C6.

El método incluye, además, el paso de transferir el medio de fermentación desde la unidad de fermentación hasta un alambique. Este paso se realiza cuando se desea completar la fermentación. Esto sucede cuando todos los carbohidratos fermentables son consumidos o cuando la velocidad de conversión del carbohidrato se reduce de tal manera que se desea la finalización de la fermentación.

En algunas formas de realización de este método, la velocidad de pretratamiento es la misma que para la planta cuando produjo etanol y/o la misma que para las plantas de etanol convencionales. Tal como se utiliza en la presente, la referencia a que una velocidad es la "misma" incluye una velocidad que es idéntica, o que está en el rango comprendido (más o menos) dentro de alrededor del 25% de la velocidad, dentro de alrededor del 15% de la velocidad, dentro de alrededor del 10% de la velocidad, dentro de alrededor del 9% de la velocidad, dentro de alrededor del 8% de la velocidad, dentro de alrededor del 7% de la velocidad, dentro de alrededor del 6% de la velocidad, dentro de alrededor del 5% de la velocidad, dentro de alrededor del 4% de la velocidad, dentro de alrededor del 3% de la velocidad, dentro de alrededor del 2% de la velocidad, dentro de alrededor del 1% de la velocidad. Por consiguiente, si la planta de etanol reestructurada tuviera una velocidad de pretratamiento de alrededor de 115 toneladas métricas por hora, una velocidad de pretratamiento dentro de alrededor del 25% de esa velocidad incluiría una velocidad que abarca desde alrededor de 7,5 toneladas por hora hasta alrededor de 12,5 toneladas por hora. La velocidad de pretratamiento se refiere a la

velocidad a la cual la carga de alimentación pretratada es conducida a una unidad de fermentación.

En algunas otras formas de realización de este método, el tiempo del ciclo para una unidad de fermentación es el mismo que para la planta cuando produjo etanol y/o el mismo que para las plantas de etanol convencionales. El "tiempo del ciclo" se refiere al tiempo transcurrido desde la introducción de un inóculo hasta el tiempo de vaciado del fermentador en un alambique. Por ejemplo, un tiempo del ciclo típico para un fermentador es de alrededor de 52 horas.

En una forma de realización, la producción de alcohol C3-C6 de la planta reestructurada es al menos de alrededor del 80% del alcohol C3-C6 equivalente de la producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración. En otras formas de realización, la producción de alcohol C3-C6 de la planta reestructurada es al menos de alrededor del 81%, al menos de alrededor del 82%, al menos de alrededor del 83%, al menos de alrededor del 84%, al menos de alrededor del 85%, al menos de alrededor del 86%, al menos de alrededor del 87%, al menos de alrededor del 88%, al menos de alrededor del 89%, al menos de alrededor del 90%, al menos de alrededor del 91%, al menos de alrededor del 92%, al menos de alrededor del 93%, al menos de alrededor del 94%, al menos de alrededor del 95%, al menos de alrededor del 96%, al menos de alrededor del 97%, al menos de alrededor del 98%, al menos de alrededor del 99% del alcohol C3-C6 equivalente de la producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración.

La "producción máxima" de una planta de alcohol es una medida de la cantidad de alcohol producida por esa planta, y se puede expresar en galones de alcohol producidos por año y otras unidades que miden el volumen o el peso por

período de tiempo. La producción de una planta depende del tamaño y diseño de la planta específica. La expresión "producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración" se refiere a la cantidad máxima etanol producida por una planta o para la cual la planta fue diseñada antes de ser reestructurada para producir un alcohol C3-C6.

Tal como se indicó con anterioridad en la presente, los microorganismos usados para la producción de etanol son tolerantes a altas concentraciones de etanol en el caldo de fermentación, pero los microorganismos usados para la producción de alcoholes C3-C6 por lo general no son tolerantes a altas concentraciones de alcoholes C3-C6. En forma ventajosa, al usar los métodos de la presente invención, es posible reestructurar una planta de etanol para producir un alcohol C3-C6 a niveles de producción comparables que con los del etanol, solamente limitados por la eficiencia de conversión teórica de ese alcohol particular. La eficiencia de conversión teórica de la glucosa en etanol, sobre la base del peso, es 51% ó 0,51. (No obstante, en la práctica, parte de la glucosa es usada por los microorganismos para la producción de masa celular y productos metabólicos distintos del alcohol; y la eficiencia de conversión real es menor que la máxima teórica.) Según la vía de fermentación usada por el microorganismo, la eficiencia de conversión teórica de la glucosa en propanol puede oscilar entre 0,33 y 0,44, la del butanol puede oscilar entre 0,27 y 0,41, la del pentanol puede oscilar entre 0,33 y 0,39, y la del hexanol can puede oscilar entre 0,28 y 0,38. El término "alcohol C3-C6 equivalente" se refiere a la relación de la eficiencia de conversión teórica de ese alcohol C3-C6 particular respecto de la del etanol y es específica para la vía de fermentación usada. Por consiguiente, el "isobutanol equivalente de etanol" (para la vía en la cual una molécula de glucosa se desintegra en una molécula de isobutanol,

dos moléculas de ATP y dos moléculas de CO₂) tal como se utiliza en la presente es $0,401 \div 0,51 = 0,806$. Por ejemplo, considérese una planta de etanol con una producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración de alrededor de 100 millones de galones/año. Al usar los métodos de la presente invención, es posible reestructurar la planta y operarla para producir butanol a una producción máxima teórica de alrededor de 80,6 millones de galones por año. Sin embargo, dado que la densidad del etanol es 0,7894 y la densidad del isobutanol es 0,8106, la producción máxima teórica real del isobutanol es de alrededor de 78 millones de galones por año. El número exacto de galones por año se puede calcular usando la información de densidad, los rendimientos teóricos y/o los rendimientos prácticos reales alcanzados.

En varias formas de realización, una planta de etanol puede ser reestructurada y operada a una producción de al menos alrededor del 80% de la producción máxima teórica para cualquier alcohol C3-C6 determinado, que compensa las diferencias de densidad. En otras formas de realización, la producción de alcohol C3-C6 de la planta reestructurada podría ser al menos de alrededor del 81%, al menos de alrededor del 82%, al menos de alrededor del 83%, al menos de alrededor del 84%, al menos de alrededor del 85%, al menos de alrededor del 86%, al menos de alrededor del 87%, al menos de alrededor del 88%, al menos de alrededor del 89%, al menos de alrededor del 90%, al menos de alrededor del 91%, al menos de alrededor del 92%, al menos de alrededor del 93%, al menos de alrededor del 94%, al menos de alrededor del 95%, al menos de alrededor del 96%, al menos de alrededor del 97%, al menos de alrededor del 98%, al menos de alrededor del 99% de la producción máxima teórica, compensando las diferencias de densidad.

Otra forma de realización de la invención es un método de extracción de un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa que incluye poner en contacto una solución acuosa con un extractor ácido basado en amina. El extractor ácido basado en amina se puede formar al acidificar una solución de amina orgánica tal como se describió con anterioridad. Ante el contacto de la solución acuosa con el extractor, la extracción se lleva a cabo al mezclar el extractor ácido basado en amina con la solución acuosa. El alcohol C3-C6 se puede recuperar de una fase del extractor que se forma después del contacto.

Varios aspectos de la invención se describen en detalle en los ejemplos que se proveen a continuación. No obstante, estos ejemplos se proveen a efectos ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención. Cada publicación y referencia citadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad. Si bien se han descrito en detalle varias formas de realización de la presente invención, es evidente que los expertos en la técnica podrán considerar modificaciones y adaptaciones para esas formas de realización. Sin embargo, ha de entenderse expresamente que dichas modificaciones y adaptaciones están dentro del alcance de la presente invención, como lo establecen las reivindicaciones ejemplares adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas usando solventes

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de alcoholes C3-C6, tales como propanol (PrOH), butanol (BuOH), isobutanol (i-BuOH) y pentanol (PenOH), a partir de soluciones acuosas usando varios solventes.

Se prepararon soluciones acuosas para cada alcohol (las concentraciones de alcohol diferían) todas las cuales fueron sub-saturadas. Cada una de las soluciones acuosas se mezcló con un solvente, tal como butilacetato, tributilfosfato, decanol, 2-heptanona u octano. La relación de fase entre la solución acuosa y el solvente difirió de un caso al otro. La acción de mezclado continuó hasta que se alcanzó el equilibrio. En equilibrio, se pudo observar la separación de fases, al formarse una fase superior rica en alcohol (fase liviana) y una fase inferior deficiente en alcohol (fase pesada). Ambas fases se analizaron en cuanto al contenido de alcohol y agua. Las concentraciones de alcohol se analizaron mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC, del inglés *High Pressure Liquid Chromatography*) a 25 °C usando una columna YMC-Pack ODS-AM. Los eluyentes fueron soluciones de metanol-agua, en las cuales la concentración del metanol era del 20%, 30%, 30% y 40% para el propanol, butanol, isobutanol y pentanol, respectivamente. El contenido de agua de las fases orgánicas se determinó mediante el método Karl-Fischer. Estos métodos analíticos también se usaron para los análisis en los otros ejemplos.

Se calculó el coeficiente de distribución del alcohol para cada experimento al dividir la concentración de alcohol en la fase liviana por la concentración de alcohol en la fase pesada. El coeficiente de distribución del agua se calculó al dividir la concentración de agua en la fase liviana por la concentración de agua en la fase pesada. El factor de enriquecimiento se calculó al dividir el coeficiente de distribución del alcohol por el coeficiente de distribución del agua. Asimismo, se calculó la relación del alcohol con respecto al agua (p/p) para la fase liviana. Los resultados se informan en las Tablas 1,1 a 1,8.

Tabla 1,1: Enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con butil acetato a 25 °C.

Fase liviana			Fase pesada			Coeficientes de distribución		Factor de enriquecimiento
i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH/ H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	Butil acetato	i-BuOH	H ₂ O	
% p	% p	p/p	% p	% p	% p	Da	Dw	
0,83	1,3	0,63	0,34	99,7	0,39	2,5	0,013	187
3,1	1,9	1,7	1,5	98,4	0,31	2,0	0,019	105
4,4	3,1	1,4	2,5	97,5	0,34	1,8	0,032	57

Tabla 1,2: Enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con tri-butil fosfato (TBP) a 25 °C.

Fase liviana			Fase pesada			Coeficientes de distribución		
i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH/ H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	TBP	i-BuOH	H ₂ O	Factor de enriquecimiento
% p	% p	p/p	% p	% p	% p	Da	Dw	
1,2	7,1	0,17	0,22	99,8	0,016	5,4	0,071	76
5,6	6,5	0,86	1,2	98,8	0,023	4,9	0,066	74
9,8	6,3	1,6	1,9	98,1	0,024	5,2	0,064	82

Tabla 1,3: Enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con decanol a 25 °C

Fase liviana			Fase pesada			Coeficientes de distribución		
i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH/ H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	Decanol	i-BuOH	H ₂ O	Factor de enriquecimiento
% p	% p	p/p	% p	% p	% p	Da	Dw	
1,11	3,8	0,29	0,30	99,7	0,0020	3,8	0,038	99
7,5	4,4	1,7	1,4	98,6	0,0043	5,2	0,045	116
12,0	4,6	2,6	2,2	97,8	0,0053	5,5	0,047	119

Tabla 1,4: Enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con 2-Heptanona a 25 °C

Fase liviana			Fase pesada			Coeficientes de distribución		
i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH/ H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	2-Heptanona	i-BuOH	H ₂ O	Factor de enriquecimiento
% p	% p	p/p	% p	% p	% p	Da	Dw	
1,15	1,7	0,68	0,44	99,2	0,40	2,6	0,017	155
5,4	2,5	2,2	1,7	98,0	0,34	3,3	0,026	125
8,4	3,5	2,4	2,0	97,7	0,29	4,1	0,036	116

Tabla 1,5: Enriquecimiento de propanol (PrOH) por contacto con octano a 24 °C

85

PrOH en fase liviana	Agua en fase liviana	PrOH en fase pesada	Agua en fase pesada			Factor de enriquecimiento
% p	% p	% p	% p	Da	Dw	
0,03	<0,05	0,66	99,3	0,047	<0,0005	>100
0,07	<0,05	1,9	98	0,037	<0,0005	>80
0,24	<0,05	5,7	94,3	0,042	<0,0005	>80

Tabla 1,6: Enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con octano a 24 °C

Fase liviana			Fase pesada		Coeficiente de distribución		
i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH/ H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	Factor de enriquecimiento
% p	% p	p/p	% p	% p	Da	Dw	
0,10	0,048	2,1	0,64	99,4	0,15	0,0005	300
0,30	0,059	5,1	1,9	98,1	0,16	0,0006	250
2,5	0,076	33	4,6	95,4	0,54	0,0008	650

Tabla 1,7: Enriquecimiento de butanol (BuOH) por contacto con octano a 24 °C

Fase liviana			Fase pesada		Coeficiente de distribución		
BuOH	H ₂ O	BuOH/	BuOH	H ₂ O	BuOH	H ₂ O	Factor de

86

		H ₂ O					enriquecimiento
% p	% p	p/p	% p	% p	Da	Dw	
0,11	0,06	1,8	0,65	99,4	0,17	0,0006	250
0,29	0,05	5,9	1,8	98,2	0,16	0,0005	300
2,5	0,07	36	4,6	95,4	0,55	0,0008	650

Tabla 1,8: Enriquecimiento de pentanol (PenOH) por contacto con octano a 24 °C

Fase liviana			Fase pesada		Coeficiente de distribución		
PenOH	H ₂ O	PenOH/ H ₂ O	PenOH	H ₂ O	PenOH	H ₂ O	Factor de enriquecimiento
% p	% p	p/p	% p	% p	Da	Dw	
0,63	0,06	10,5	0,59	99,4	1,08	0,006	180
2,95	0,08	37	1,5	98,5	2,0	0,03	67
12,6	0,50	25	2,7	97,3	4,6	0,13	35

Los resultados muestran que el enriquecimiento depende del alcohol y del solvente seleccionado. Por ejemplo, para los alcoholes de menor peso molecular, los solventes más polares –tales como butil acetato y tri-butil fosfato– tuvieron coeficientes de distribución superiores en comparación con aquellos de un solvente menos polar, tales como octano. Ante la extracción por octano, los alcoholes con pesos moleculares mayores se extrajeron de mejor manera. Para una determinada combinación de alcohol y solvente, los coeficientes de distribución y el de factor

87

enriquecimiento dependieron de la concentración de alcohol en la fase acuosa en equilibrio. Aún así, para todos los solventes evaluados, se observó un factor de enriquecimiento alto. La fase liviana o superior fue la fase rica en alcohol en todos los casos. La relación del alcohol con respecto al agua fue entre 50 y 600 veces superior en la fase liviana en comparación con la fase pesada.

Ejemplo 2: Extracción de isobutanol a partir de soluciones acuosas usando solventes

Este ejemplo ilustra la eficiencia del enriquecimiento de isobutanol a partir de soluciones acuosas subsaturadas usando varios solventes. La Tabla 2 resume los resultados de varios experimentos de enriquecimiento de isobutanol. El isobutanol se extrajo de las soluciones acuosas de varias concentraciones de inicio. Se usaron varios solventes para llevar a cabo una extracción de un solo paso a 25 °C. Asimismo, la relación de la fase de solvente con respecto a la fase acuosa varió. La concentración de isobutanol en el solvente se midió para cada experimento y el rendimiento de extracción se calculó para cada experimento al dividir la cantidad de alcohol en el solvente por la cantidad de alcohol inicial en la solución acuosa.

Tabla 2: Enriquecimiento de i-BuOH a partir de soluciones acuosas de varias concentraciones con varios extractores: butil acetato (BuAc), decanol (DeOH), tri-butil-fosfato (TBP) y 2-heptanona.

Conc. inicial de i-BuOH (% p) en solución acuosa	Solvente	Solvente/solución acuosa (relación p/p)	Conc. final de i-BuOH (% p) en solución acuosa	Conc. de i-BuOH (% p) en solución solvente	Rendimiento de extracción (%)
--	----------	---	--	--	--

0,7	Butil acetato	0,5	0,3	0,8	60
0,8	decanol	0,5	0,3	1,1	60
1,0	2- Heptanona	0,5	0,4	1,1	60
1,4	tri-butil fosfato	1,0	0,2	1,2	85
1,6	2- Heptanona	1,0	0,4	1,1	75
2,0	Butil acetato	2,0	0,3	0,8	85
2,5	decanol	2,0	0,3	1,1	85
2,6	tri-butil fosfato	2,0	0,2	1,2	90
2,7	2- Heptanona	2,0	0,4	1,1	85
3,0	Butil acetato	0,5	1,5	3,1	50
4,0	tri-butil fosfato	0,5	1,1	5,6	72
4,4	2- Heptanona	0,5	1,7	5,4	61
4,6	butil acetato	1,0	1,5	3,1	67
4,7	butil acetato	0,5	2,5	4,4	47
5,1	decanol	0,5	1,4	7,5	73

8,0	butil acetato	1,5	2,1	3,9	80
8,0	tri-butil fosfato	1,3	1,1	5,6	80
8,0	decanol	1,7	0,8	4,2	80
8,0	2- Heptanona	0,7	2,0	8,4	90
8,0	tri-butil fosfato	0,6	1,9	9,8	90
8,0	decanol	0,5	2,2	12,0	95

Los experimentos mostraron que se pudieron alcanzar valores de rendimiento de extracción altos. Estos valores de rendimiento de extracción altos no se limitaron a altas concentraciones de inicio de isobutanol o a relaciones altas de la fase de solvente con respecto a la fase acuosa. Los valores de rendimiento de extracción altos pudieron observarse tanto para las concentraciones de inicio bajas de isobutanol como para las proporciones bajas de solvente usado.

Asimismo, los experimentos mostraron que la concentración de isobutanol en la fase acuosa se pudo reducir a cantidades muy bajas incluso cuando se comenzó con una solución de isobutanol saturada. Esto permite reciclar una corriente acuosa al comienzo de la fermentación sin limitar la productividad de alcohol de los microorganismos, ya que la presencia de altas concentraciones de alcohol en el caldo de fermentación puede impactar en forma adversa la habilidad de los microorganismos para producir alcohol.

Ejemplo 3: Enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas usando gasolina.

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas al entrar en contacto con gasolina.

Las soluciones acuosas de alcoholes C3-C6, con inclusión de propanol (PrOH), butanol (BuOH), isobutanol (i-BuOH) y pentanol (PenOH), se prepararon y se mezclaron con gasolina hasta que se alcanzó el equilibrio. La gasolina usada era de grado comercial con una clasificación de 95 octanos. En equilibrio, la mezcla formó una fase superior rica en alcohol (fase liviana) y una fase inferior deficiente en alcohol (fase pesada). Ambas fases se analizaron en cuanto al contenido de alcohol y agua. El coeficiente de distribución del alcohol se calculó para cada experimento al dividir la concentración de alcohol en la fase liviana por la concentración en la fase pesada. De manera similar, el coeficiente de distribución para el agua se calculó al dividir la concentración de agua en la fase liviana por la concentración de agua en la fase pesada. El factor de enriquecimiento se calculó al dividir el coeficiente de distribución del alcohol por el coeficiente de distribución del agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 24 °C. Los resultados se informan en las Tablas 3,1 a 3,4.

Tabla 3,1: Enriquecimiento de 1-butanol (BuOH) por contacto con gasolina a 24 °C

Composición de la fase liviana		Composición de la fase pesada		Coeficientes de distribución		Factor de enriquecimiento
BuOH	H ₂ O	BuOH	H ₂ O	BuOH	H ₂ O	
% p	% p	% p	% p	Da	Dw	

0,34	0,04	0,55	99,5	0,62	0,0004	>1000
1,27	0,10	1,64	98,4	0,77	0,001	770
7,3	0,34	3,8	96,2	1,9	0,0036	540

Tabla 3,2: Enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con gasolina
a 24 °C

Composición de la fase liviana			Composición de la fase pesada		Coeficientes de distribución		Factor de enriquecimiento
i-BuOH	H ₂ O	gasolina	i-BuOH	H ₂ O	i-BuOH	H ₂ O	
% p	% p	% p	% p	% p	Da	Dw	
0,38	0,08	99,6	0,58	99,4	0,66	0,0008	800
1,05	0,11	98,8	1,62	98,4	0,65	0,0011	600
1,71	0,12	98,2	2,15	97,8	0,80	0,0012	700
5,00	0,34	94,7	3,07	96,9	1,63	0,0035	460
6,1	0,33	93,5	3,96	96,0	1,55	0,0034	450
15,8	1,20	83,0	4,4	95,6	3,6	0,012	300
23,0	2,0	75,0	4,7	95,3	4,8	0,021	230
33,0	2,7	64,3	5,3	94,7	6,3	0,028	220
49	5,2	45,8	6,8	93,2	7,2	0,056	130
57	6,7	36,1	7,2	92,8	7,9	0,072	110
65	7,6	26,9	7,4	92,6	8,8	0,082	100
62	7,9	29,7	7,3	92,7	8,6	0,085	100
80	14,2	5,9	(1)	(1)			
75	11,1	13,7	(1)	(1)			

(1) no se formó suficiente fase pesada para ser analizada.

Tabla 3,3: Enriquecimiento de Pentanol (PenOH) por contacto con gasolina a 24 °C

Composición de la fase liviana		Composición de la fase pesada		Coeficientes de distribución		Factor de enriquecimiento
PenOH	H ₂ O	PenOH	H ₂ O	PenOH	H ₂ O	
% p	% p	% p	% p	Da	Dw	
1,00	0,10	0,60	99,4	1,68	0,001	>1000
4,9	0,33	1,15	98,8	4,2	0,0033	>1000
17,8	1,52	2,7	97,3	6,6	0,016	400

Table3,4: Enriquecimiento de propanol (PrOH) por contacto con gasolina a 24 °C

PrOH en fase liviana	Agua en fase liviana	PrOH en fase pesada	Agua en fase pesada			Factor de enriquecimiento
% p	% p	% p	% p	Da	Dw	
0,08	<0,05	0,61	99,3	0,12	<0,0005	>240
0,16	<0,05	1,9	98	0,08	<0,0005	>160
0,50	<0,05	5,1	94,3	0,10	<0,0005	>200

Para todos los alcoholes evaluados, se observaron factores de enriquecimiento altos al entrar en contacto con gasolina. La relación del alcohol con respecto al agua abarcó una relación desde alrededor de 100 hasta >1000 veces superior en la fase liviana en comparación con la fase pesada. La fase

liviana/superior fue la fase rica en alcohol en todos los casos. Los experimentos mostraron que se pueden alcanzar factores de enriquecimiento altos usando gasolina. Estos factores de enriquecimiento altos no se limitaron a las concentraciones de inicio altas de alcohol y a las relaciones altas de la fase de solvente con respecto a la fase acuosa, ya que los valores de enriquecimiento altos pudieron obtenerse con concentraciones de inicio bajas de alcohol y cantidades bajas de gasolina.

Además, en el caso del isobutanol, la concentración de alcohol en la fase acuosa se pudo reducir a cantidades muy bajas incluso cuando se comenzó con una solución saturada de isobutanol. Esto permite reciclar una corriente acuosa al inicio de la fermentación sin limitar la productividad de alcohol de los microorganismos, ya que la presencia de altas concentraciones de alcohol en el caldo de fermentación puede impactar de manera adversa la habilidad de los microorganismos para producir alcohol.

Ejemplo 4: Enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas usando gasolina y adición de glucosa.

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas mediante la adición de glucosa seguido de contacto con gasolina. Las soluciones acuosas de alcoholes C3-C6, con inclusión de butanol (BuOH), isobutanol (I-BuOH) y pentanol (PenOH), se prepararon y se agregó glucosa a una concentración final del 20% (p/p). Estas soluciones se mezclaron luego con gasolina. La gasolina usada era de grado comercial con una clasificación de 95 octanos. En equilibrio, se observó la separación de fases en donde se formó una fase superior rica en alcohol (fase liviana) y una fase inferior deficiente en

alcohol (fase pesada). Ambas fases se analizaron en cuanto al contenido de alcohol y agua. El coeficiente de distribución del alcohol se calculó para cada experimento al dividir la concentración de alcohol en la fase liviana por la concentración en la fase pesada. El coeficiente de distribución para el agua se calculó de conformidad. El factor de enriquecimiento se calculó al dividir el coeficiente de distribución del alcohol por el coeficiente de distribución del agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 24 °C. Los resultados se informan en Tabla 4.

Tabla 4: El efecto de la glucosa sobre el enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con gasolina a 24 °C

	Composición de la fase liviana		Composición de la fase pesada		
	Alcohol	H ₂ O	Alcohol	H ₂ O	
	% p	% p	% p	% p	
Isobutanol	1,9	0,11	1,4	78,6	1,36
Butanol	1,9	0,11	1,5	78,5	1,27
Pentanol	3,4	0,12	0,16	79,8	21

El efecto de la adición de glucosa se puede observar al comparar estos resultados con los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 3. La concentración del alcohol en la fase de gasolina se incrementó 1,6 veces para el butanol, 2 veces para el isobutanol y más de 10 veces para el pentanol en presencia de glucosa. Los factores de enriquecimiento se incrementaron en aproximadamente los mismos factores.

Ejemplo 5: Enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas usando gasolina y adición de cloruro de calcio.

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas diluidas mediante la adición de cloruro de calcio seguido de contacto con gasolina. Las soluciones acuosas de alcoholes C3-C6, con inclusión de butanol (BuOH), isobutanol (I-BuOH) y pentanol (PenOH), se prepararon, y se agregó cloruro de calcio a una concentración final del 15% (p/p). Estas soluciones se mezclaron luego con gasolina. La gasolina usada era de grado comercial con una clasificación de 95 octanos. En equilibrio, se observó la separación de fases, en donde se formó una fase superior rica en alcohol (fase liviana) y una fase inferior deficiente en alcohol (fase pesada). Ambas fases se analizaron en cuanto al contenido de alcohol y aguas. El coeficiente de distribución del alcohol se calculó para cada experimento al dividir la concentración de alcohol en la fase liviana por la concentración en la fase pesada. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 24 °C. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: El efecto del cloruro de calcio sobre el enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) por contacto con gasolina a 24 °C

	Composición de la fase liviana		Composición de la fase pesada		
	Alcohol	H ₂ O	Alcohol	H ₂ O	Alcohol
	% p	% p	% p	% p	Da
Isobutanol	3,3	0,17	0,94	84,1	3,5
Butanol	2,6	0,16	0,86	84,1	3,0
Pentanol	2,2	0,08	0,14	84,9	15

El efecto de la adición de cloruro de calcio se puede observar al comparar estos resultados con los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 3. La concentración del alcohol en la fase de gasolina se incrementó 3 veces para el butanol, 4,5 veces para el isobutanol y más de 10 veces para el pentanol en presencia de cloruro de calcio. Los factores de enriquecimiento se incrementaron en aproximadamente los mismos factores.

Ejemplo 6: Enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas saturadas usando gasolina y la adición de un compuesto hidrófilo.

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de alcoholes C3-C6 a partir de soluciones acuosas saturadas mediante la adición de cloruro de calcio o glucosa seguido de contacto con gasolina.

Se prepararon las soluciones acuosas saturadas de alcoholes C3-C6, con inclusión de butanol (BuOH), isobutanol (i-BuOH) y pentanol (PenOH), mediante la adición de alcohol en agua hasta la separación de fases. La fase pesada se aisló y se agregó cloruro de calcio o glucosa a la misma a una concentración final del 15% (p/p) y del 20% (p/p), respectivamente. Estas soluciones se mezclaron luego con gasolina. La gasolina usada era de grado comercial con una clasificación de 95 octanos. En equilibrio, se observó la separación de fases, en donde se formó una fase superior rica en alcohol (fase liviana) y una fase inferior pobre en alcohol (fase pesada). Ambas fases se analizaron en cuanto al contenido de alcohol y agua. El rendimiento de extracción se calculó para cada experimento al dividir la cantidad de alcohol en el solvente por la cantidad de alcohol inicial en la solución. Se realizó una extracción de una etapa a 24 °C. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: El efecto de glucosa y cloruro de calcio sobre el enriquecimiento de isobutanol (i-BuOH) n-butanol (BuOH) y n-Pentanol (Pentanol) por contacto con gasolina a 24 °C

Alcohol C3-C6	Aditivo	Conc. de alcohol inicial (% p) en solución acuosa	Solvente/solució n acuosa (relación p/p)	Conc. de alcohol final (% p) en solución acuosa	Conc. de alcohol (% p) en solución solvente	Rendimiento de extracción (%)
i-BuOH	—	8,0	6,4	1,6	1,0	80
i-BuOH	20% de glucosa	8,0	3,4	1,4	1,9	80
i-BuOH	15% de CaC12	8,0	2,1	0,9	3,3	90
BuOH	—	8,0	4,9	1,6	1,3	80
BuOH	20% de glucosa	8,0	3,4	1,5	1,9	80
BuOH	15% de CaC12	8,0	2,7	0,9	2,6	90
Pentanol	—	2,7	2,1	0,6	1,0	75
Pentanol	20% de glucosa	2,7	0,8	0,16	3,4	90
Pentanol	15% de CaC12	2,7	1,2	0,14	2,2	90

Los resultados ilustran que se pudieron alcanzar valores superiores de rendimiento de extracción si había glucosa o cloruro de calcio en la solución. Por consiguiente, se puede extraer una mayor fracción de alcohol por una menor cantidad de gasolina. Al mismo tiempo, se alcanzaron menores concentraciones de alcohol en la solución acuosa remanentes.

Ejemplo 7: Separación de fases de propanol a partir de soluciones acuosas mediante adición de un compuesto hidrófilo

Este ejemplo ilustra la inducción de la separación de fases de propanol en soluciones acuosas mediante la adición de un compuesto hidrófilo. Se prepararon las soluciones acuosas de propanol y se agregaron compuestos hidrófilos, con inclusión de cloruro de calcio, sucrosa o glucosa, a varias concentraciones finales. Se advirtió el número de fases líquidas presentes en cada mezcla a 25 °C. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Enriquecimiento al agregar soluto hidrófilo a soluciones de propanol

Soluto hidrófilo	Concentración de soluto	Número de fases
Ninguno		1
CaC12	9,5%	1
CaCl ₂	15,1%	2
Glucosa	40%	1
Glucosa	60%	2
Sucrosa	40%	2

El propanol es completamente miscible con agua, ya que forma una única fase líquida cuando se mezcla con agua en cualquier proporción. Esto también es cierto si se agregan concentraciones bajas de compuestos hidrófilos a la solución acuosa de propanol. Sin embargo, la adición de una concentración suficientemente alta, que depende del compuesto hidrófilo particular usado, generó la formación de sistemas de dos fases en donde el propanol estaba altamente enriquecido en la fase liviana en comparación con la fase pesada.

Ejemplo 8: Separación de fases de butanol terciario (o t-butanol) a partir de soluciones acuosas mediante la adición de glucosa

Este ejemplo ilustra la inducción de la separación de fases de t-butanol (t-BuOH) en solución acuosa mediante la adición de glucosa. Una solución acuosa de t-butanol (50% v/v) se preparó a 25 °C y se agregó glucosa a una concentración final del 20% (w/v). Se formaron dos fases líquidas, en las cuales el 42% del volumen era la fase pesada y el 58% la fase liviana. Ambas fases se analizaron en cuanto a la concentración de t-butanol. Las concentraciones de t-BuOH y glucosa en la fase pesada eran de alrededor de 150g/L y alrededor del 45% p/p, respectivamente. La fase liviana tuvo alrededor de 520 g/L de t-BuOH.

El t-BuOH es completamente miscible con agua, ya que forma una única fase cuando se mezcla con agua en cualquier proporción. Sin embargo, la adición de glucosa generó la formación de dos fases. El t-BuOH se enriqueció en la fase liviana en comparación con la fase pesada por un factor de alrededor de 3,5.

Ejemplo 9: Separación de fases y concentración de soluciones saturadas de butanol e isobutanol mediante adición de glucosa

Este ejemplo ilustra la inducción de la separación de fases de butanol o isobutanol en soluciones acuosas mediante la adición de glucosa. Se prepararon las soluciones acuosas del 7% de butanol (BuOH) o isobutanol (i-BuOH) y se agregó glucosa a una concentración final del 20% (p/p). Se formaron dos fases líquidas para ambos alcoholes. Las fases liviana y pesada se analizaron en cuanto al contenido de alcohol para cada experimento. Los resultados se informan en Tabla 9. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C. El coeficiente de distribución se calculó al dividir la concentración de butanol en la fase liviana por la concentración de butanol en la fase pesada.

Tabla 9: Enriquecimiento al agregar glucosa a soluciones acuosas de butanol y isobutanol

Alcohol	Alcohol en fase liviana (% p/p)	Alcohol en fase pesada (%) p/p)	Coeficiente de distribución
BuOH	85	4,3	20
i-BuOH	87	5,1	17

Los resultados de este experimento muestran que la adición de glucosa a soluciones sub-saturadas de butanol e isobutanol fuerza la separación de fases. Se formaron dos fases líquidas en las cuales la fase liviana/superior es rica en alcohol y la fase pesada/inferior es deficiente en alcohol (rica en agua). El butanol estuvo más concentrado en la fase liviana por 20 veces en comparación con la fase pesada y por aproximadamente 12 veces en comparación con la solución inicial. El isobutanol estuvo más concentrado en la fase liviana por 17 veces en comparación con la fase pesada y por aproximadamente 12 veces en comparación con la solución inicial.

Ejemplo 10: Separación de fases y concentración de soluciones sub-saturadas de isobutanol mediante la adición de glucosa

Este ejemplo ilustra la inducción de separación de fases para el isobutanol en soluciones acuosas mediante la adición de glucosa. Se prepararon las soluciones acuosas sub-saturadas de isobutanol, y se agregó glucosa a una concentración final del 5% al 20% (p/p). Se formaron dos fases líquidas para todas las concentraciones. Cada fase liviana y fase pesada se analizó en cuanto al contenido de isobutanol. Los resultados se informan en Tabla 10. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C. El coeficiente de distribución se calculó al dividir la concentración de isobutanol en la fase liviana por la concentración de isobutanol en la fase pesada.

Tabla 10:

Composición de la fase liviana		Composición de la fase pesada		Coeficiente de distribución
H ₂ O	i-BuOH	Glucosa	i-BuOH	
% p	% p	% p	% p	
16,1	83,9	5,0	8,3	10
15,1	84,9	10,6	6,8	12,5
13,7	86,2	20,4	5,7	15

Los resultados de este experimento muestran que la adición de glucosa a las soluciones sub-saturadas de isobutanol fuerza la separación de fases. Se formaron dos fases líquidas en las cuales la fase liviana/superior es rica en alcohol y la fase

pesada/inferior es deficiente en alcohol (rica en agua). El coeficiente de distribución se incrementó con concentraciones superiores de glucosa.

Ejemplo 11: Separación de fases de soluciones acuosas sub-saturadas de butanol e isobutanol mediante la adición de cloruro de calcio

Este ejemplo ilustra la inducción de separación de fases de butanol o isobutanol en soluciones acuosas mediante adición de cloruro de calcio. Se prepararon soluciones acuosas del 4% de butanol (BuOH) o isobutanol (i-BuOH) y se agregó cloruro de calcio a una concentración final del 15% (p/p). Se formaron dos fases líquidas para ambos alcoholes. La fase liviana y la fase pesada se analizaron en cuanto al contenido de alcohol para cada experimento. Los resultados se informan en Tabla 11. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C. El coeficiente de distribución se calculó al dividir la concentración de butanol en la fase liviana por la concentración de butanol en la fase pesada.

Tabla 11: Enriquecimiento mediante adición de cloruro de calcio a soluciones acuosas de butanol e isobutanol .

Alcohol	Alcohol en fase liviana (% p/p)	Alcohol en fase pesada (%p/p)	Coeficiente de distribución
BuOH	90	2,3	39
i-BuOH	91	2,9	31

Los resultados de este experimento muestran que la adición de cloruro de calcio a soluciones sub-saturadas de butanol e isobutanol fuerza la separación de fases. Se formaron dos fases líquidas en las cuales la fase liviana/superior es rica en alcohol y la fase pesada/inferior es deficiente en alcohol. El butanol estuvo más

concentrado en la fase liviana por 39 veces en comparación con la fase pesada y por aproximadamente 23 veces en comparación con la solución inicial. El isobutanol estuvo más concentrado en la fase liviana por 31 veces en comparación con la fase pesada y por aproximadamente 23 veces en comparación con la solución inicial.

Ejemplo 12: Enriquecimiento de butanol mediante adsorción

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de butanol mediante adsorción.

El experimento se llevó a cabo usando Amberlite® XAD 16, que es un adsorbente polimérico reticulado hidrófobo no iónico para extraer el butanol a partir de una solución acuosa. La capacidad de adsorción de Amberlite® XAD 16 deriva de su estructura macromolecular, área de alta superficie y naturaleza aromática de su superficie.

Se prepararon soluciones acuosas sub-saturadas de butanol y se pusieron en contacto con la resina. El experimento se llevó a cabo a 25 °C. La resina y la solución acuosa de butanol se mezclaron y se agitaron durante 1,5 h. Después de agitar, la resina se separó de la solución acuosa. La composición de la solución acuosa separada de la resina después del enriquecimiento y el coeficiente de distribución se informan en Tabla 12.

Tabla 12: Enriquecimiento por contacto con Amberlite® XAD 16

Composición de solución	Composición de resina	Coeficiente de distribución
BuOH	BuOH /resina	Da
% p	% p	
2,9	30,0	10,3

1,39	21,5	15,5
0,45	10,4	23
0,11	4,0	35

Los resultados de este experimento muestran alta eficiencia del enriquecimiento. El butanol estuvo más concentrado en la resina en comparación con la concentración en la solución acuosa con coeficientes de distribución, desde alrededor de 10 hasta alrededor de 35.

Ejemplo 13: Enriquecimiento de isobutanol a partir de soluciones acuosas con extractores ácidos basados en amina

Este ejemplo ilustra la eficiencia de la extracción de isobutanol de las soluciones acuosas sub-saturadas usando un extractor ácido basado en amina.

Para alcanzar concentraciones de amina de 1 mol/kg, se mezcló trioctilamina con decano. Esta solución orgánica tuvo que ser posteriormente acidificada con ácido sulfúrico. Para esto, la solución de amina se mezcló con ácido sulfúrico (30% o 75% de ácido p/p) lo que generó la extracción de partes del ácido en la fase orgánica. La mezcla formó dos fases que se separaron y la fase orgánica acidificada se usó como el extractor ácido para la extracción de isobutanol a partir de una solución acuosa. La extracción se llevó a cabo al mezclar el extractor ácido con las soluciones acuosas de isobutanol a 25 °C hasta que se alcanzó el equilibrio. Las fases se separaron luego y se analizaron. En algunos casos solamente se formó una fase de extractor, mientras que en otros casos se pudo observar dos fases de extractor. Cuando se formaron dos fases de extractor, estas fases se combinaron y se agregó octanol, que actuó como co-solvente, para forzar la formación de una

única fase líquida. La fase combinada se analizó y los resultados se corrigieron en cuanto a la dilución mediante el co-solvente. La fase acuosa y la fase de extractor se analizaron en cuanto a la de concentración ácido sulfúrico e isobutanol. Los resultados se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Enriquecimiento por contacto con un extractor ácido basado en amina

Fase de extractor			Fase acuosa			
Número de fases de extractor	i-BuOH	H ₂ SO ₄	i-BuOH	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	i-BuOH
	% p	Mol eq./Kg	% p	Mol eq./Kg	% p	Da
2	2,6	1,77	0,26	2,5	12,1	10,1
2	1,28	1,77	0,11	2,6	12,7	11,6
2	3,4	1,05	0,90	0,45	2,20	3,7
1	7,9	1,05	2,2	0,25	1,24	3,6
1	3,5	1,06	1,29	0,22	1,09	2,7
2	2,1	1,03	0,48	0,20	0,97	4,4
2	1,18	1,05	0,13	0,19	0,94	9,3

Los resultados muestran grandes coeficientes de distribución para la extracción en el extractor ácido basado en amina. Los coeficientes de distribución dependieron de la concentración de ácido sulfúrico en el extractor ácido.

Cuando la concentración de ácido sulfúrico en el extractor fue de alrededor de un equivalente por mol de amina, los coeficientes de distribución fueron similares o

ligeramente superiores en comparación con los coeficientes de distribución determinados para los solventes polares, tales como tri-butil-fosfato y decanol (ver el Ejemplo 1). Sin embargo, cuando las concentraciones del ácido sulfúrico fueron superiores, se observaron coeficientes de distribución muy altos (>10).

Ejemplo 14: Enriquecimiento de isobutanol a partir de soluciones acuosas diluidas con bajas cantidades de extractores ácidos basados en amina

Este ejemplo ilustra la eficiencia del enriquecimiento de isobutanol a partir de soluciones acuosas diluidas de isobutanol usando bajas cantidades de extractor ácido basado en amina.

Para alcanzar concentraciones de amina de 1 mol/kg, se mezcló trioctilamina con decano. Esta solución orgánica tuvo que ser posteriormente acidificada con ácido sulfúrico. Para esto, la solución de amina se mezcló con ácido sulfúrico (30% o 75% de ácido p/p) lo que generó la extracción de partes del ácido en la fase orgánica. La mezcla formó dos fases que se separaron y la fase orgánica acidificada se usó como el extractor ácido para el enriquecimiento de isobutanol a partir de una solución acuosa. El enriquecimiento se llevó a cabo al mezclar el extractor ácido con las soluciones acuosas de isobutanol a 25 °C hasta que se alcanzó el equilibrio. Las fases luego se separaron y se analizaron. En algunos casos solamente se formó una fase de extractor, mientras que en otros casos se pudo observar dos fases de extractor. Cuando se formaron dos fases de extractor, estas fases se combinaron y se agregó octanol, que actuó como co-solvente, para forzar la formación de una única fase líquida. La fase combinada se analizó y los resultados se corrigieron en cuanto a la dilución mediante el co-solvente. La fase acuosa y la fase de extractor se

analizaron en cuanto a la de concentración ácido sulfúrico e isobutanol, se calculó el rendimiento de extracción y los resultados se resumen en la Tabla 14

Tabla 14: Enriquecimiento de i-BuOH a partir de soluciones acuosas de varias concentraciones en extractores ácidos basados en amina

Conc. inicial de i-BuOH (% p) en solución acuosa	Conc. de H ₂ SO ₄ en el extractor (% p)	Solvente/solució n acuosa (relación p/p)	Conc. final de i-BuOH (% p) en solución acuosa	Conc. de i- BuOH (% p) en el extractor	Rendimiento de extracción (%)
6,1	1,05	0,5	2,2	7,9	64
3,0	1,05	0,5	1,29	3,5	56
2,6	1,05	1,0	0,48	2,1	80
1,3	1,05	1,0	0,13	1,18	90
4,3	1,05	1,0	0,90	3,4	80
1,6	1,8	0,5	0,26	2,6	80
1,4	1,8	1,0	0,11	1,3	93

Los resultados muestran que se pueden alcanzar valores altos de rendimiento de extracción mediante una extracción de un solo paso a 25 °C incluso para relaciones bajas del solvente con relación a la fase acuosa. Además, se pudieron alcanzar los mismos valores altos de rendimiento de extracción para concentraciones iniciales bajas de isobutanol en agua. Además, la concentración de isobutanol en la fase acuosa se pudo reducir a concentraciones muy bajas para todas las concentraciones iniciales. Esto permite reciclar una corriente acuosa al

108

inicio de la fermentación sin limitar la productividad de alcohol de los microorganismos.

Ejemplo 15: Enriquecimiento por contacto con tamices moleculares

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de soluciones de alcohol/agua mediante la adsorción de agua en tamices moleculares.

Se prepararon soluciones de alimentación de alcohol/agua de isopropanol, isobutanol e isopentanol. Para el isopropanol, se usó una solución que contenía alrededor del 6,5% en peso de agua como corriente alimentación. Para el isobutanol y el isopentanol, se mezclaron volúmenes aproximadamente iguales de agua y alcohol. Se permitió que la mezcla se separara y se descartó la fase de alcohol saturada en agua (fase liviana) y se usó como corriente de alimentación. Las columnas consistían de sustrato de cerámica secada en horno, y se prepararon lechos de tamices moleculares con malla de 8x12 de 3 Ångstrom. La columna usada en el caso del isopropanol tuvo una relación de longitud con respecto al diámetro de 20. Las columnas usadas en los casos del isobutanol y el isopentanol tuvieron una relación de longitud con respecto al diámetro de 40. Cada solución de alimentación se bombeó independientemente desde el fondo hasta el tope a través de una columna separada a un caudal de 10 ml/min. Se recolectaron muestras del producto corriente abajo de las columnas para cada corriente de alcohol y se analizaron en cuanto al contenido de agua usando un coulómetro Karl Fischer. Tal como se ilustra en la columna ROH/H₂O a continuación, la relación del alcohol con respecto al agua (ROH/H₂O) se incrementó en la corriente de producto en comparación con la corriente de alimentación, lo que indica que la corriente de producto se enriqueció en alcohol. Tal como se ilustra en la columna $C_{\text{producto}}/C_{\text{alimentación}}$, la concentración de

alcohol en la relación de la corriente de producto con respecto a la corriente de alimentación ($C_{\text{producto}}/C_{\text{alimentación}}$) es superior a 1, lo que indica que la corriente de producto se enriqueció en alcohol.

Alcohol	Enriquecimiento	
	ROH/H ₂ O	$C_{\text{producto}}/C_{\text{alimentación}}$
Alimentación de Isopropanol	14	1,1
Producto de Isopropanol	339	
Alimentación de Isobutanol	6	1,2
Producto de Isobutanol	1147	
Alimentación de Isopentanol	9	1,1
Producto Isopentanol	2724	

Ejemplo 16: Enriquecimiento mediante generación de composición azeotrópica de isobutanol y agua

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de isobutanol mediante la generación de composición azeotrópica de isobutanol y agua a una presión de alrededor de 990 mbar.

Una solución del 4,7% en peso de isobutanol en solución acuosa se agregó a un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con un accesorio cabezal de destilación de pasaje corto, lectora de temperatura de vapor, y receptor de condensado de tope de 25 ml. El matraz de 250 ml se calentó con una placa caliente eléctrica. El isobutanol en la solución acuosa en el matraz de destilación se calentó hasta que se formó vapor y se condensó en el matraz de tope. Se registró la temperatura del vapor y la mezcla de solución se analizó en cuanto al contenido de isobutanol. La temperatura del vapor de la solución en ebullición era de alrededor de 89 °C a 92 °C. El vapor azeotrópico se recolectó en un matraz de tope y se condensó. El material condensado de tope formó una fase liviana de 10,3 mL y una fase pesada de 3,1 mL. La composición de la fase liviana era de 670 g/L de isobutanol y la fase pesada rica en agua era de 86 g/L de isobutanol. La muestra post-destilación remanente en el matraz de fondo redondo contenía 17 g/L de isobutanol.

El ejemplo demuestra la concentración eficiente de isobutanol a 670 g/L comenzando con una solución diluida con un contenido de 47 g/L de isobutanol al generar el vapor azeotrópico de punto de ebullición mínimo y condensar el vapor en una fase liviana rica en isobutanol y fase pesada rica en agua.

Ejemplo 17: Enriquecimiento mediante generación de composición azeotrópica de 1-butanol y agua

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de 1-butanol mediante la generación de la composición azeotrópica de 1-butanol y agua a una presión de alrededor de 990 mbar.

111

Una solución del 4,6% en peso de 1-butanol en agua se agregó a un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con un accesorio cabezal de destilación de pasaje corto, lectora de temperatura de vapor, y receptor de condensado de tope de 25 ml. El matraz de 250 ml se calentó con una placa caliente eléctrica. La solución en el matraz de destilación se calentó hasta que se formó vapor. Se registró la temperatura del vapor y se realizó análisis de la composición en el condensado de tope y la muestra post-destilación en el matraz. La temperatura del vapor condensado osciló entre 92 °C y 93,5 °C. El vapor azeotrópico se recolectó en el matraz de tope y se condensó. El material condensado de tope formó una fase liviana de 8,1 mL y una fase pesada de 2,8 mL. La composición de la fase liviana era de 687 g/L de 1-butanol y la fase pesada rica en agua era de 80 g/L de 1-butanol. La muestra post-destilación era de 20 g/L de 1-butanol. El ejemplo demuestra la eficiente concentración de 1-butanol comenzando con una composición diluida de 46 g/L al generar el vapor azeotrópico de punto de ebullición mínimo y condensar el vapor en una fase liviana rica en isobutanol y fase pesada rica en agua.

Ejemplo 18: Enriquecimiento mediante generación de composición azeotrópica de isobutanol y agua

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de isobutanol a partir del caldo de fermentación mediante la generación de la composición azeotrópica de isobutanol y agua a una presión de alrededor de 990 mbar.

Se agregó solución de una fermentación por lote de laboratorio que contenía 2 g/L de isobutanol a un matraz de fondo redondo de 250 ml que tenía un accesorio cabezal de destilación de pasaje corto, lectora de temperatura de vapor, y receptor de condensado de tope de 25 ml. El matraz de 250 ml se calentó con una placa

caliente eléctrica. La solución en el matraz de destilación se calentó hasta que se formó vapor y se condensó en el matraz de tope. Se registró la temperatura del vapor y se realizó análisis de la composición en el condensado de tope y la muestra post-destilación en el matraz. La temperatura del vapor condensado osciló entre 89 °C y 92 °C. El vapor azeotrópico se condensó y se recolectó en el matraz de tope. La composición del material condensado de tope fue de 40 g/L de isobutanol. La muestra post-destilación fue de 1 g/L de 1-butanol.

Ejemplo 19: Enriquecimiento mediante generación de composición azeotrópica de isobutanol y agua

Este ejemplo demuestra el enriquecimiento de isobutanol mediante la generación de composición azeotrópica de isobutanol y agua a una presión de alrededor de 155 mbar.

Una solución de 400 mL de una fermentación por lote de laboratorio que contenía 6 g/L de isobutanol se agregó a un aparato de evaporación al vacío giratorio de 1000 mL. El matraz de evaporación al vacío giratorio se calentó con un baño de agua caliente. El material vaporizado se condensó con agua congelada contra un condensador de laboratorio de vidrio conectado a una fuente de vacío. Una termocupla para vapor en la corriente de vapor registró la temperatura del vapor. El material condensado se recolectó en un matraz de recolección de vacío de 100 mL. En el experimento, se empujó vacío en el sistema hasta que se formó vapor. Se registró la temperatura del vapor y se realizó análisis de la composición en el condensado de tope y la muestra post-destilación.

La temperatura del vapor condensado osciló entre 27 y 30 °C a 155 mbar absoluto. El vapor azeotrópico se condensó y se recolectó en el matraz de tope. El

material condensado de tope formó una fase liviana de 0,26 mL y una fase pesada de 0,21 mL. La composición de la fase liviana fue de 623 g/L de isobutanol y la fase pesada rica en agua fue de 115 g/L de 1-butanol. La muestra post-destilación fue de 3 g/L de isobutanol. El ejemplo demuestra la concentración eficiente al comenzar con una composición diluida inicial y generar el azeótropo de punto de ebullición mínimo en vapor. La división del volumen en la separación de fases no fue mensurable debido al pequeño volumen total de la muestra.

Los métodos generales usados en los Ejemplos 20 a 25 y 32 a 33 se describen a continuación.

Preparación de la muestra: Todas las muestras (2 mL) de los experimentos de fermentación realizados en matraces de agitación se almacenaron a -20 °C para el posterior análisis del sustrato y del producto. Antes del análisis, las muestras se descongelaron, se mezclaron bien y luego se centrifugaron 14,000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizó el análisis mediante HPLC o GC (del inglés, *Gas Chromatography*) de los sustratos y productos usando estándares auténticos (>99%, obtenido de Sigma-Aldrich), y una curva de calibración de cinco puntos (con 1-pentanol como estándar interno para análisis mediante cromatografía de gases).

Determinación de la densidad óptica y del peso seco celular: La densidad óptica de los cultivos se determinó a 600 nm usando un espectrofotómetro DU 800 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). Las muestras se diluyeron lo necesario para obtener una densidad óptica entre 0,1 y 0,8. El peso seco celular se determinó al centrifugar 50 mL de cultivo antes de decantar el sobrenadante. El sedimento (*pellet*) celular se lavó una vez con 50 mL de H₂O milliQ, se centrifugó y el sedimento se

lavó nuevamente con 25 mL de H₂O milliQ. El sedimento celular se secó luego a 80 °C durante al menos 72 horas. El peso seco celular se calculó al sustraer el peso del depósito de la centrífuga del peso del depósito de la centrífuga que contenía el sedimento celular secado. Para los cultivos de *E. coli*, se usó un factor de conversión de OD₆₀₀ a peso seco celular de 0,25.

Cromatografía de gases: se realizó un análisis de compuestos orgánicos volátiles, con inclusión de etanol y isobutanol, en un cromatógrafo de gases HP 5890 equipado con un extractor de muestras automático HP 7673, una columna DB-FFAP (J&W; 30 m de longitud, 0,32 mm de ID, 0,25 µM de grosor de película) o equivalente que se conectó a un detector de ionización de llama o FID (del inglés, *Flame Ionization Detector*). El programa de temperatura fue el siguiente: 200 °C para el inyector, 300 °C para el detector, 100 °C para horno durante 1 minuto, 70 °C/minuto gradiente a 235 °C, y luego se mantuvo durante 2,5 minutos. El análisis se realizó usando estándares auténticos (>99%, obtenido de Sigma-Aldrich), y una curva de calibración de 5 puntos con 1-pentanol como estándar interno.

Cromatografía líquida de alto rendimiento: el análisis de la glucosa y de los ácidos orgánicos se realizó en un sistema de cromatografía líquido de alto rendimiento HP-1100 equipado con una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300x7,8mm) o equivalente y una columna de guardia para análisis catiónico H⁺ (Bio-Rad) o equivalente. Los ácidos orgánicos se detectaron usando un detector UV HP-1100 (referencia 210nm, 8nm, 360nm) mientras que la glucosa se detectó usando un detector de índice de refracción HP-1100. La temperatura de la columna era de 60 °C. Este método fue isocrático con ácido sulfúrico 0,008N en

agua en fase móvil. El flujo se estableció a 0,6 mL/min. El tamaño de la inyección era de 20 µL y el tiempo de funcionamiento fue de 30 minutos.

Biología molecular y cultivo celular bacteriano: se usaron generalmente métodos de biología molecular para clonación y construcción de plásmido, a menos que se indicara lo contrario (Sambrook, J., Russel, D. W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Las técnicas de biología molecular y AND recombinante estándares utilizadas en los Ejemplos son ampliamente conocidas en el arte y se describen en la publicación realizada por Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; y por T.J. Silhavy, MX. Bennan, y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1984) y por Ausubel, F. M. et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc, y Wiley-Interscience (1987).

Los métodos y materiales generales adecuados para el mantenimiento y cultivo de rutina de los cultivos bacterianos son ampliamente conocidos en el arte. Las técnicas adecuadas para uso en los siguientes ejemplos pueden encontrarse en publicaciones tales como *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1994)) o la de Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989).

Preparación de células electrocompetentes y transformación: Se desarrolló un cultivo de cepas aceptoras en medio SOB (Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular*

Cloning, A Laboratory Manual. 3ra ed. 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) a una OD₆₀₀ de alrededor de 0,6 a 0,8. El cultivo se concentró 100 veces, se lavó una vez con agua helada y 3 veces con glicerol al 10% helado. Las células se resuspendieron luego en 150 µL de glicerol al 10% helado y se tomaron en alícuotas de porciones de 50 µL. Estas alícuotas se usaron inmediatamente para transformación estándar o se almacenaron a -80 °C. Estas células se transformaron con el(los) plásmido(s) deseado(s) mediante electroporación. Después de la electroporación, se agregó inmediatamente medio SOC (Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) a las células. Después de la incubación durante una hora a 37 °C, las células se depositaron en placas LB que contenían los antibióticos apropiados y se incubaron toda la noche a 37 °C.

Ejemplo 20: Producción y recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación

Este ejemplo ilustra la producción y la recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación.

GEVO 1780 es un biocatalizador bacteriano modificado que contiene genes en dos plásmidos que codifican un pasaje de enzimas que convierten piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador GEVO 1780 entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Se inició un cultivo iniciador toda la noche en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con células GEVO 1780 de una reserva congelada con un volumen de 40 mL de medio M9 modificado formado por

85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 μ M de citrato férrico, 5,72 mg/L H_3BO_3 , 3,62 mg/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,444 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,78 mg/L de $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,158 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0988 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6,0 g/L de NaHPO_4 , 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl , 2,0 g/L de NH_4Cl , 0,0444 g/L de MgSO_4 y 0,00481 g/L de CaCl_2 y a una OD_{600} del cultivo de alrededor de 0,05. El cultivo iniciador se desarrolló durante aproximadamente 14 hrs en un agitador a 30 °C a 250 rpm. Parte del cultivo iniciador se transfirió luego a un recipiente de fermentación DasGip de 2000 mL que contenía alrededor de 1500 mL de medio M9 modificado para alcanzar una OD_{600} del cultivo inicial de alrededor de 0,1. El recipiente de fermentación se conectó a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. El recipiente se agitó con agitación mínima de 400 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 50% usando un inyector de aire de 25 sL/h hasta que la OD_{600} alcanzó alrededor de 1,0. El recipiente luego se indujo con 0,1 mM de IPTG. Después de continuar el cultivo durante aproximadamente 8 a 10 horas, el contenido de oxígeno disuelto se redujo al 5% con agitación mínima a 400 rpm y 10 sl/h de flujo de aire. Se realizó la medición continua del gas descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al oxígeno, isobutanol, etanol y dióxido de carbono en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en todo experimento y se usaron para medir la OD_{600} , la concentración de glucosa y la concentración de isobutanol en el caldo. En el transcurso del experimento, se agregaron suplementos de células del biocatalizador pre-cultivadas y pre-inducidas como concentrado en tres oportunidades desde el inicio del experimento: a 21 h, 38 h y 46,3 h. Estas células

eran la misma cepa y los plásmidos que se citaron con anterioridad y se usaron en el fermentador. Las células que se agregaron como suplemento se desarrollaron como cultivos de 1 L en matraces Fernbach de 2,8 L y se incubaron a 30 °C, 250 RPM en medio M9 modificado con 85 g/L de glucosa. Los cultivos se indujeron ante la inoculación 0,1 mM de IPTG. Cuando las células habían alcanzado una OD₆₀₀ de alrededor de 4,0 a 5,0, el cultivo se concentró mediante centrifugación y luego se agregó al fermentador. Una alimentación de glucosa estéril de 500 g/L de glucosa en agua DI se usó de manera intermitente durante la fase de producción del experimento a en períodos mayores a 12 horas para mantener la concentración de glucosa en el fermentador de alrededor de 30 g/L o más.

El recipiente de fermentación se ajustó mediante un sistema de tubos a un recipiente de fermentación más pequeño de 400 mL que sirvió como tanque flash y funcionó en un bucle de recirculación con el fermentador. Las células del biocatalizador dentro del recipiente de fermentación se aislaron del tanque flash por medio de un filtro de flujo transversal en línea con el bucle de recirculación fermentador/tanque flash. El filtro solamente permitió que el caldo de fermentación libre de células fluyera desde el recipiente de fermentación hasta el tanque flash. El volumen en el tanque flash fue de aproximadamente 100 mL y el tiempo de retención hidráulica fue de alrededor de 10 minutos. Se aplicó calor y vacío al tanque flash. El nivel de vacío aplicado al tanque flash se fijó inicialmente a 45 mBar y el tanque flash se fijó a alrededor de 45 °C. Estos parámetros se ajustaron para mantener aproximadamente 6 a 10 g/L de isobutanol en el fermentador en el transcurso del experimento. Generalmente, el vacío osciló entre 45 y 100 mBar y la temperatura del tanque flash abarcó desde 43 °C hasta 45 °C en el transcurso del experimento. El vapor del tanque flash calentado se condensó en un recipiente de

recolección como destilado. El caldo de fermentación libre de células se devolvía continuamente desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación.

El destilado recuperado en el experimento fue fuertemente enriquecido en isobutanol. El isobutanol formó un azeótropo con agua y usualmente generó un destilado de dos fases: una fase superior rica en isobutanol y una fase inferior deficiente en isobutanol. Las muestras del destilado se analizaron mediante GC en cuanto a la concentración de isobutanol. La producción de isobutanol alcanzó el máximo a alrededor de 95 hrs con una concentración por lote de alrededor de 63 g/L. La velocidad de producción del isobutanol fue de alrededor de 0,64 g/L/h y el rendimiento teórico porcentual fue de aproximadamente el 86%.

Ejemplo 21: Producción y recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación

Este ejemplo ilustra la producción y la recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación.

GEVO 1780 es un biocatalizador bacteriano modificado que contiene genes en dos plásmidos que codifican un pasaje de enzimas que convierten piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador GEVO 1780 entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Se inició un cultivo iniciador toda la noche en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con células de GEVO 1780 de una reserva congelada con un volumen de 40 mL de medio M9 modificado formado por 85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 µM de citrato férrico, 5,72 mg/L de H_3BO_3 , 3,62 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,444 mg/L de $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 0,78 mg/L de $Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$, 0,158 mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,0988 mg/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 6,0

g/L de NaHPO_4 , 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl , 2,0 g/L de NH_4Cl , 0,0444 g/L de MgSO_4 y 0,00481 g/L de CaCl_2 y a una OD_{600} del cultivo de 0,02 a 0,05. El cultivo iniciador se desarrolló durante aproximadamente 14 hrs en un agitador a 30 °C a 250 rpm. Parte del cultivo iniciador se transfirió luego a un recipiente de fermentación DasGip de 2000 mL que contenía alrededor de 1500 mL de medio M9 modificado para alcanzar una OD_{600} del cultivo inicial de alrededor de 0,1. El recipiente se conectó a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. El recipiente se agitó con agitación mínima de 400 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 50% usando un inyector de aire de 25 sL/h hasta que la OD_{600} alcanzó alrededor de 1,0. El recipiente luego se indujo con 0,1 mM de IPTG. Después de continuar el cultivo durante aproximadamente 8 a 10 horas, el contenido de oxígeno disuelto se redujo al 5% con agitación mínima a 400 rpm y 10 sl/h de flujo de aire. Se realizó la medición continua del gas descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al oxígeno, isobutanol, etanol y dióxido de carbono en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en todo experimento y se usaron para medir la OD_{600} , la concentración de glucosa y la concentración de isobutanol en el caldo. En el transcurso del experimento, se agregaron suplementos de células del biocatalizador pre-cultivadas y pre-inducidas como concentrado después del inicio del experimento: a 48 h y 75 h. Estas células eran la misma cepa y los plásmidos que se citaron con anterioridad y se usaron en el fermentador. Las células que se agregaron como suplemento se desarrollaron como cultivos de 1 L en matraces Fernbach de 2,8 L y se incubaron a 30 °C, 250 RPM en medio M9 modificado con 85 g/L de glucosa. Los

cultivos se indujeron ante la inoculación 0,1 mM de IPTG. Cuando las células habían alcanzado una OD_{600} de alrededor de 4,0 a 5,0, el cultivo se concentró mediante centrifugación y luego se agregó al fermentador. Una alimentación de glucosa estéril de 500 g/L de glucosa en agua DI se usó de manera intermitente durante la fase de producción del experimento a en períodos mayores a 12 horas para mantener la concentración de glucosa en el fermentador de alrededor de 30 g/L o más.

El recipiente de fermentación se ajustó mediante un sistema de tubos a un recipiente de fermentación más pequeño de 400 mL que sirvió como tanque flash y funcionó en un bucle de recirculación con el fermentador. Las células del biocatalizador dentro del recipiente de fermentación se aislaron del tanque flash por medio de un filtro de flujo transversal en línea con el bucle de recirculación fermentador/tanque flash. El filtro solamente permitió que el caldo de fermentación libre de células fluyera desde el recipiente de fermentación hasta el tanque flash. El volumen en el tanque flash fue de aproximadamente 100 mL y el tiempo de retención hidráulica fue de alrededor de 10 minutos. Se aplicó calor y vacío al tanque flash. El nivel de vacío aplicado al tanque flash se fijó inicialmente a alrededor de 50 mBar y el tanque flash se fijó a alrededor de 45 °C. Estos parámetros se ajustaron para mantener aproximadamente 6 a 13 g/L de isobutanol en el fermentador en el transcurso del experimento. Generalmente, el vacío osciló entre 45 y 100 mBar y la temperatura del tanque flash abarcó desde 43 °C hasta 45 °C en el transcurso del experimento. El vapor del tanque flash calentado se condensó en un recipiente de recolección como destilado. El caldo de fermentación libre de células se devolvía continuamente desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación.

El destilado recuperado en el experimento fue fuertemente enriquecido en isobutanol. El isobutanol formó un azeótropo con agua y usualmente generó un destilado de dos fases: una fase superior rica en isobutanol y una fase inferior deficiente en isobutanol. Las muestras del destilado se analizaron mediante GC en cuanto a la concentración de isobutanol. La producción de isobutanol alcanzó un máximo a alrededor de 118 hrs con una concentración por lote de alrededor de 87 g/L. La velocidad de producción del isobutanol fue de alrededor de 0,74 g/L/h en promedio en el transcurso del experimento. El rendimiento teórico porcentual del isobutanol fue de aproximadamente el 90,4% al final del experimento.

Ejemplo 22: Sistema integrado de fermentación y recuperación para isobutanol

Este ejemplo ilustra una forma de realización de un sistema integrado de fermentación y recuperación para un alcohol C3-C6.

GEVO 1780 es un biocatalizador bacteriano modificado que contiene genes en dos plásmidos que codifican un pasaje de enzimas que convierten piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador GEVO 1780 entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Se inició un cultivo iniciador toda la noche en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con células de GEVO 1780 de una reserva congelada con un volumen de 40 mL de medio M9 modificado formado por 85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 µM de citrato férrico, 5,72 mg/L de H₃BO₃, 3,62 mg/L de MnC₁₂,4H₂O, 0,444 mg/L de ZnSO₄,7H₂O, 0,78 mg/L de Na₂MnO₄,2H₂O, 0,158 mg/L de CuSO₄,5H₂O, 0,0988 mg/L de CoC₁₂,6H₂O, 6,0 g/L de NaHPO₄, 3,0 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de NaCl, 2,0 g/L de

NH₄C1, 0,0444 g/L de MgSO₄ y 0,00481 g/L de CaC1₂ y a una OD₆₀₀ del cultivo de alrededor de 0,05. El cultivo iniciador se desarrolló durante aproximadamente 14 hrs en un agitador a 30 °C a 250 rpm. Parte del cultivo iniciador se transfirió luego a un recipiente de fermentación DasGip de 2000 mL que contenía alrededor de 1500 mL de medio M9 modificado para alcanzar una OD₆₀₀ del cultivo inicial de alrededor de 0,1. El recipiente se conectó a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. El recipiente se agitó con agitación mínima de 400 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 50% usando un inyector de aire de 25 sL/h hasta que la OD₆₀₀ alcanzó alrededor de 1,0. El recipiente luego se indujo con 0,1 mM de IPTG. Después de continuar el cultivo durante aproximadamente 8 a 10 horas, el contenido de oxígeno disuelto se redujo al 5% con agitación mínima a 400 rpm y 10 sl/h de flujo de aire. Se realizó la medición continua del gas descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al oxígeno, isobutanol, etanol y dióxido de carbono en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en el transcurso del experimento y se usaron para medir la OD₆₀₀, la concentración de glucosa y la concentración de isobutanol en el caldo. En el transcurso del experimento, se agregaron suplementos de células del biocatalizador pre-cultivadas y pre-inducidas como concentrado después del inicio del experimento: a 62,5 h, 87 h, 113 h, y 142 h. Estas células eran la misma cepa y los plásmidos que se citaron con anterioridad y se usaron en el fermentador. Las células que se agregaron como suplemento se desarrollaron como cultivos de 1 L en matraces Fernbach de 2,8 L y se incubaron a 30 °C, 250 RPM en medio M9 modificado. Los cultivos se indujeron ante la inoculación 0,1 mM de IPTG.

Cuando las células habían alcanzado una OD_{600} de alrededor de 4,0 a 5,0, el cultivo se concentró mediante centrifugación y luego se agregó al fermentador. Una alimentación de glucosa estéril de 500 g/L de glucosa en agua DI se usó de manera intermitente durante la fase de producción del experimento a períodos mayores a 12 horas para mantener la concentración de glucosa en el fermentador de alrededor de 30 g/L o más.

El recipiente de fermentación se ajustó mediante un sistema de tubos a un recipiente de fermentación más pequeño de 400 mL que sirvió como tanque flash y funcionó en un bucle de recirculación con el fermentador. El volumen en el tanque flash fue de aproximadamente 100 mL y el tiempo de retención hidráulica fue de alrededor de 5 a 10 minutos. Se aplicó calor y vacío al tanque flash. El nivel de vacío aplicado al tanque flash se fijó inicialmente a alrededor de 40 mBar y el tanque flash se fijó a alrededor de 36 °C. Estos parámetros se ajustaron para mantener aproximadamente 5 a 10 g/L de isobutanol en el fermentador en el transcurso del experimento. Generalmente, el vacío osciló entre alrededor de 20 y 50 mBar y la temperatura del tanque flash fue de alrededor de 36 °C en el transcurso del experimento. El vapor del tanque flash calentado se condensó en un recipiente de recolección como destilado. El caldo de fermentación se devolvía continuamente desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación.

El destilado recuperado en el experimento fue fuertemente enriquecido en isobutanol. El isobutanol formó un azeótropo con agua y generó un destilado de dos fases: una fase superior rica en isobutanol y una fase inferior deficiente en isobutanol. Las muestras del destilado se analizaron mediante GC en cuanto a la

concentración de isobutanol. La producción de isobutanol alcanzó un máximo a alrededor de 166 hrs con una concentración por lote de alrededor de 106 g/L. La velocidad de producción del isobutanol fue de alrededor de 0,64 g/L/h y el rendimiento teórico porcentual fue de aproximadamente el 91% al final del experimento.

Ejemplo 23: Producción y recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación

Este ejemplo ilustra la producción y recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación.

GEVO 1780 es un biocatalizador bacteriano modificado que contiene genes en dos plásmidos que codifican un pasaje de enzimas que convierten piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador GEVO 1780 entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Se iniciaron cultivos iniciadores toda la noche en cuatro matraces Fernbach 2,8 L con células de GEVO 1780 de una reserva congelada con cuatro volúmenes de 1000 mL de medio M9 modificado formado por 85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 µM de citrato férrico, 5,72 mg/L de H₃BO₃, 3,62 mg/L de MnC₁₂,4H₂O, 0,444 de mg/L ZnSO₄,7H₂O, 0,78 mg/L de Na₂MnO₄,2H₂O, 0,158 mg/L de CuSO₄,5H₂O, 0,0988 mg/L de CoC₁₂,6H₂O, 6,0 g/L de NaHPO₄, 3,0 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de NaCl, 2,0 g/L de NH₄Cl, 0,0444 g/L de MgSO₄ y 0,00481 g/L de CaC₁₂ y a una OD₆₀₀ del cultivo de de alrededor de 0,05. Los cultivos se indujeron con 1 mM de IPTG al punto de inoculación y se desarrollaron durante aproximadamente 14 hrs en un agitador a 30 °C a 250 rpm. A aproximadamente 14 horas, los contenidos de los matraces se

vertieron en botellas plásticas graduadas estériles de 500 ml y se centrifugaron durante 20 minutos a 4500 rpm. Las células se resuspendieron en medio M9 modificado sin glucosa de alrededor de 100 ml de volumen total, luego se transfirieron a un recipiente de fermentación DasGip de 2000 mL que contenía alrededor de 1500 mL de medio M9 modificado, en donde la glucosa se reemplazó por maíz clarificado licuado para brindar una concentración de glucosa aproximada de alrededor de 100 g/L y alcanzar una OD_{600} del cultivo inicial de alrededor de 10. El maíz clarificado licuado se preparó al incubar una pasta de maíz triturado a alrededor de 60 °C durante alrededor de 24 horas a la cual se habían agregado enzimas alfa-amilasa y gluco-amilasa en cantidades suficientes para liberar glucosa libre del almidón de maíz. Después de alrededor de 24 horas de tratamiento tal como se describió con anterioridad, el maíz licuado se clarificó mediante centrifugación y filtración para extraer la mayoría de los sólidos y generar una solución de maíz licuado clarificado de alrededor de 250 g/L glucosa. El recipiente de fermentación se conectó a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. El recipiente se agitó con agitación mínima de 400 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 5% usando un inyector de aire de 10 sL/h. Se realizó la medición continua del gas descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al oxígeno, isobutanol, etanol y dióxido de carbono en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en el transcurso del experimento y se usaron para medir la OD_{600} , la concentración de glucosa y la concentración de isobutanol en el caldo. Se agregaron suplementos de células del biocatalizador pre-cultivadas y pre-

inducidas como concentrado en el transcurso del experimento. Estas células eran la misma cepa y los plásmidos que se citaron con anterioridad y se usaron en el fermentador. Las células que se agregaron como suplemento se desarrollaron como cultivos de 1 L en matraces Fernbach de 2,8 L y se incubaron a 30 °C, 250 RPM en medio M9 modificado usando glucosa como principal fuente de carbono. Los cultivos se indujeron ante la inoculación con 1 mM de IPTG. Cuando las células habían alcanzado una OD₆₀₀ de alrededor de 2,0 a 5,0, el cultivo se concentró mediante centrifugación y luego se agregó al fermentador. Una alimentación de maíz licuado clarificado que contenía alrededor de 250 g/L de glucosa se usó de manera intermitente durante el experimento para mantener la concentración de glucosa en el fermentador de alrededor de 30 g/L o más.

El recipiente de fermentación se ajustó mediante un sistema de tubos a un recipiente de fermentación más pequeño de 400 mL que sirvió como tanque flash y funcionó en un bucle de recirculación con el fermentador. El volumen en el tanque flash fue de aproximadamente 100 mL y el tiempo de retención hidráulica fue de alrededor de 5 a 10 minutos. Se aplicó calor y vacío al tanque flash. El nivel de vacío aplicado al tanque flash se fijó inicialmente a alrededor de 40 mBar y el tanque flash se fijó a alrededor de 36 °C. Estos parámetros se ajustaron para mantener aproximadamente 5 a 10 g/L de isobutanol en el fermentador en el transcurso del experimento. Generalmente, el vacío osciló entre alrededor de 20 y 50 mBar y la temperatura del tanque flash fue de alrededor de 36 °C en el transcurso del experimento. El vapor del tanque flash calentado se condensó en un recipiente de recolección como destilado. El caldo de fermentación se devolvía continuamente desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación.

El destilado recuperado en el experimento fue fuertemente enriquecido en isobutanol. El isobutanol formó un azeótropo con agua y generó un destilado de dos fases: una fase superior rica en isobutanol y una fase inferior deficiente en isobutanol. Las muestras del destilado se analizaron mediante GC en cuanto a la concentración de isobutanol. La producción de isobutanol alcanzó un máximo a alrededor de 217 hrs con una concentración por lote de alrededor de 124 g/L. La velocidad de producción del isobutanol fue de alrededor de 0,57 g/L/h en promedio en el transcurso del experimento pero se alcanzó una velocidad de producción máxima del isobutanol de alrededor de 1,3 g/L/h. El rendimiento teórico porcentual fue de aproximadamente el 74% al final del experimento, pero se alcanzó un rendimiento teórico máximo del 88% durante el experimento.

Ejemplo 24: Producción y recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación

Este ejemplo ilustra la producción y recuperación de isobutanol usando un sistema integrado de fermentación y recuperación.

GEVO 1780 es un biocatalizador bacteriano modificado que contiene genes en dos plásmidos que codifican un pasaje de enzimas que convierten piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador GEVO 1780 entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Se inició un cultivo iniciador toda la noche en un matraz Fernbach de 2,8 L con células de GEVO 1780 de una reserva congelada con un volumen de 1000 mL de medio M9 modificado formado por 85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 µM de citrato férrico, 5,72 mg/L de H_3BO_3 , 3,62 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,444 mg/L de $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 0,78 mg/L

de $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,158 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0988 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6,0 g/L de NaHPO_4 , 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl , 2,0 g/L de NH_4Cl , 0,0444 g/L de MgSO_4 y 0,00481 g/L de CaCl_2 y a una OD_{600} del cultivo de alrededor de 0,05. El cultivo se indujo con 1 mM de IPTG al punto de inoculación y se desarrolló durante aproximadamente 14 hrs en un agitador a 30 °C a 250 rpm. A aproximadamente 14 horas, los contenidos del matraz se vertieron en botellas plásticas graduadas estériles de 500 ml y se centrifugaron durante 20 minutos a 4500 rpm. Las células se resuspendieron en medio M9 modificado de alrededor de 40 ml de volumen total, luego se transfirieron a un recipiente de fermentación DasGip de 2000 mL que contenía alrededor de 1500 mL de medio M9 modificado, en donde la glucosa se reemplazó por maíz licuado con una concentración de alrededor del 17% de sólidos secos y para alcanzar una OD_{600} del cultivo inicial de alrededor de 3. El maíz licuado, que se trató con alfa-amilasa, se preparó al diluir maíz licuado esterilizado con una concentración de sólidos secos de alrededor del 35% con agua desionizada estéril a una concentración de sólidos secos final de alrededor del 17%. El maíz licuado diluido se agregó luego a los componentes del medio M9 modificado descrito con anterioridad, sin glucosa adicional, y se colocó en el recipiente de fermentación de 2000 mL. Al punto de inoculación, se agregó una dosis de gluco-amilasa al recipiente de fermentación en cantidad suficiente para hidrolizar los oligómeros del almidón de maíz presentes en el maíz licuado a glucosa monomérica. El recipiente se conectó a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. El recipiente se agitó con agitación mínima de 400 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 5% usando un inyector de aire de 10 sL/h. Se realizó la medición continua del gas

descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al oxígeno, isobutanol, etanol y dióxido de carbono en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en el transcurso del experimento y se usaron para medir la concentración de glucosa y la concentración de isobutanol en el caldo. Se agregaron suplementos de células del biocatalizador pre-cultivadas y pre-inducidas como concentrado en todo este experimento. Estas células eran la misma cepa y los plásmidos que se citaron con anterioridad y se usaron en el fermentador. Las células que se agregaron como suplemento se desarrollaron como cultivos de 1 L en matraces Fernbach de 2,8 L y se incubaron a 30 °C, 250 RPM en medio M9 modificado usando glucosa como principal fuente de carbono. Los cultivos se indujeron ante la inoculación con 1 mM de IPTG. Cuando las células habían alcanzado una OD₆₀₀ de alrededor de 2,0 a 5,0, el cultivo se concentró mediante centrifugación y luego se agregó al fermentador. Se preparó una alimentación de maíz licuado al agregar una dosis de gluco-amilasa en cantidad suficiente para hidrolizar los oligómeros presentes en el maíz licuado a glucosa monomérica y se sometió a incubación a alrededor de 50 °C durante 24 horas antes del uso. La solución resultante contenía alrededor de 188 g/L de glucosa y se usó de manera intermitente durante el experimento para mantener la concentración de glucosa en el fermentador de alrededor de 40 g/L o más.

El recipiente de fermentación se ajustó mediante un sistema de tubos a un recipiente de fermentación más pequeño de 400 mL que sirvió como tanque flash y funcionó en un bucle de recirculación con el fermentador. El volumen en el tanque flash fue de aproximadamente 100 mL y el tiempo de retención hidráulica fue de alrededor de 5 a 10 minutos. Se aplicó calor y vacío al tanque flash. El nivel de vacío aplicado al tanque flash se fijó inicialmente a alrededor de 40 mBar y el tanque flash

se fijó a alrededor de 36 °C. Estos parámetros se ajustaron para mantener aproximadamente 5 a 10 g/L de isobutanol en el fermentador en el transcurso del experimento. Generalmente, el vacío osciló entre alrededor de 20 y 50 mBar y la temperatura del tanque flash fue de alrededor de 36 °C en el transcurso del experimento. El vapor del tanque flash calentado se condensó en un recipiente de recolección como destilado. El caldo de fermentación se devolvía continuamente desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación.

El destilado recuperado en el experimento fue fuertemente enriquecido en isobutanol. El isobutanol formó un azeótropo con agua y generó un destilado de dos fases: una fase superior rica en isobutanol y una fase inferior deficiente en isobutanol. Las muestras del destilado se analizaron mediante GC en cuanto a la concentración de isobutanol. La producción de isobutanol alcanzó un máximo a alrededor de 166 hrs con una concentración por lote de alrededor de 30 g/L. La velocidad de producción del isobutanol fue de alrededor de 0,31 g/L/h en promedio en el transcurso del experimento. El rendimiento teórico porcentual no fue determinado en este experimento.

Ejemplo 25: Sistema integrado de fermentación y recuperación para isobutanol

Este ejemplo ilustra una forma de realización de un sistema integrado anaeróbico de fermentación por lote y recuperación para un alcohol C3-C6 y muestra que un microorganismo manipulado produce un alcohol C3-C6 a un rendimiento superior a alrededor del 95% del rendimiento teórico.

Se inició un cultivo iniciador toda la noche en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con células de GEVO 1780 de una reserva congelada con un volumen de 1000

mL de medio M9 modificado formado por 85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 μ M de citrato férrico, 5,72 mg/L de H_3BO_3 , 3,62 mg/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,444 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,78 mg/L de $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,158 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0988 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6,0 g/L de NaHPO_4 , 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl , 2,0 g/L de NH_4Cl , 0,0444 g/L de MgSO_4 y 0,00481 g/L de CaCl_2 y a una OD_{600} del cultivo de alrededor de 0,05. El cultivo iniciador se desarrolló durante aproximadamente 14 horas en un agitador a 30 °C a 250 rpm. Parte del cultivo iniciador se transfirió a un recipiente de fermentación DasGip de 2000 mL que contenía alrededor de 1500 mL de medio M9 modificado para alcanzar una OD_{600} de cultivo inicial de alrededor de 0,1. El recipiente de fermentación se conectó a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. El recipiente se agitó con agitación mínima de 400 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 50% usando un inyector de aire de 25 sL/h hasta que la OD_{600} alcanzó alrededor de 1,0. El recipiente se indujo luego con 0,1 mM de IPTG. Después de un desarrollo continuo durante alrededor de 3 horas, el contenido de oxígeno disuelto se redujo al 0% con agitación a 200 rpm e inyección 2,5 sL/h con gas nitrógeno (N_2). Se realizó la medición continua del gas descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al isobutanol, etanol y dióxido de carbono en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en el transcurso del experimento y se usaron para medir la OD_{600} , la concentración de glucosa y la concentración de isobutanol en el caldo. En el transcurso del experimento, se agregaron suplementos de células del biocatalizador pre-cultivadas y pre-inducidas como concentrado en varias oportunidades desde el

inicio del experimento. Estas células eran la misma cepa y los plásmidos que se citaron con anterioridad y se usaron en el fermentador. Las células que se agregaron como suplemento se desarrollaron como cultivos de 1 L en matraces Fernbach de 2,8 L y se incubaron a 30 °C, 250 RPM en medio M9 modificado con 85 g/L de glucosa. Los cultivos se indujeron ante la inoculación con 0,1 mM de IPTG. Cuando las células alcanzaron una OD₆₀₀ de alrededor de 4,0 a 5,0, el cultivo se concentró mediante centrifugación y luego se agregó al fermentador. Se usó una alimentación de glucosa estéril de 500 g/L en agua DI de manera intermitente durante la fase de producción del experimento a intervalos superiores a 12 horas para mantener la concentración de glucosa en el fermentador de alrededor de 30 g/L o más.

El recipiente de fermentación se ajustó mediante un sistema de tubos a un recipiente de fermentación más pequeño de 400 mL que sirvió como tanque flash y funcionó en un bucle de recirculación con el fermentador. El volumen en el tanque flash fue de aproximadamente 100 mL y el tiempo de retención hidráulica fue de alrededor de 10 minutos. Se aplicó calor y vacío al tanque flash. El nivel de vacío aplicado al tanque flash se fijó inicialmente a alrededor de 45 mBar y el tanque flash se fijó a alrededor de 36 °C. Estos parámetros se ajustaron para mantener aproximadamente 6 a 10 g/L de isobutanol en el fermentador en el transcurso del experimento. Generalmente, el vacío osciló entre alrededor de 30 y 100 mBar y la temperatura del tanque flash osciló entre alrededor de 34 °C y 36 °C en el transcurso del experimento. El vapor del tanque flash calentado se condensó en un recipiente de recolección como destilado. El caldo de fermentación se devolvía continuamente desde el tanque flash hasta el recipiente de fermentación.

El destilado recuperado en el experimento fue fuertemente enriquecido en isobutanol. El isobutanol formó un azeótropo con agua y generó un destilado de dos fases: una fase superior rica en isobutanol y una fase inferior deficiente en isobutanol. Las muestras del destilado se analizaron mediante GC en cuanto a la concentración de isobutanol. La producción de isobutanol alcanzó un máximo con una concentración por superior a 50 g/L. El rendimiento teórico porcentual fue de aproximadamente el 95%.

Ejemplo 26: Enriquecimiento mediante destilación al vacío

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de soluciones acuosas insaturadas de isobutanol mediante destilación al vacío.

El dispositivo para la destilación constó de un recipiente de reacción de 3 cuellos, un condensador refrigerado con agua y un matraz de recolección. Durante cada destilación, se usó una manta de calentamiento eléctrico para calentar el recipiente de reacción; se usó un baño de recirculación para enfriar el condensador con agua entre 3 y 5 °C; y una bomba de vacío mantuvo un vacío de aproximadamente 50 mBar absoluto. Se colocaron termómetros para medir la temperatura de la solución de reacción y del baño de agua. Se tomaron muestras del matraz de recolección y del recipiente de reacción una vez que se recolectó un volumen buscado de 1 a 5 ml. Se realizaron tres destilaciones con soluciones acuosas de isobutanol de aproximadamente 5, 15 y 40 g/L.

Durante la destilación de la solución de 5 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 35,2 °C. Se recolectó 1,75 ml de material de fase única. Se concentró 4,1 g/L del material inicial 21 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. Durante la destilación de la solución de 15 g/L, la

condensación comenzó a una temperatura del líquido de 34,3 °C. Se recolectó 2 ml de la fase pesada y 0,5 ml de la fase liviana. Se concentró 12,3 g/L del material inicial 17 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. Durante la destilación de la solución de 40 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 31,9 °C. Se recolectó 2,5 ml de la fase pesada y 3,5 ml de la fase liviana. Se concentró 43,2 g/L del material inicial 10 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. La concentración de isobutanol (g/L) de varias soluciones durante las 3 destilaciones de isobutanol se resume en la tabla que sigue.

Tabla 26

	Destilaciones de isobutanol		
	5 g/L	15 g/L	40 g/L
Solución de inicio	4,1	12,3	43,2
Depósito final	3,5	10,7	36,8
Recolección: pesada	86,7	86,9	91,9
Recolección: liviana	-	717,8	706,6

El incremento en la concentración de isobutanol de la solución inicial hasta la fase de vapor se ilustra en la tabla que sigue.

	Destilaciones de isobutanol
--	-----------------------------

	5 g/L	15 g/L	40 g/L
Concentración en fase de vapor	21x	17x	10x

Ejemplo 27: Enriquecimiento mediante destilación al vacío

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de soluciones acuosas insaturadas de isopentanol mediante destilación al vacío.

El dispositivo para la destilación constó de un recipiente de reacción de 3 cuellos, un condensador refrigerado con agua y un matraz de recolección. Durante cada destilación, se usó una manta de calentamiento eléctrico para calentar el recipiente de reacción; se usó un baño de recirculación para enfriar el condensador con agua entre 3 y 5 °C; y una bomba de vacío mantuvo un vacío de aproximadamente 50 mBar absoluto. Se colocaron termómetros para medir la temperatura de la solución de reacción y la temperatura del baño de agua. Se tomaron muestras del matraz de recolección y del recipiente de reacción una vez que se recolectó un volumen buscado de 1 a 5 ml. Se realizaron tres destilaciones con soluciones acuosas de isopentanol de aproximadamente 5, 15 y 40 g/L.

Durante la destilación de la solución de 5 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 35,2 °C. Se recolectó 2,5 ml de material de fase única. Se concentró 4,2 g/L del material inicial 7 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. Durante la destilación de la solución de 15 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 34,3 °C. Se recolectó 3 ml de la fase pesada y 1 ml de la fase liviana. Se concentró 12,2 g/L del material inicial

17 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. Durante la destilación de la solución de 40 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 33,5 °C. Se recolectó 5 ml de la fase pesada y 3 ml de la fase liviana. Se concentró 31,5 g/L del material inicial 10 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. La concentración de isopentanol (g/L) de varias soluciones durante las 3 destilaciones de isopentanol se resume en la tabla que sigue.

	Destilaciones de Isopentanol		
	5 g/L	15 g/L	40 g/L
Solución de inicio	4,2	12,2	31,5
Depósito final	3,4	10,2	23,7
Recolección: pesada	31,2	34,1	35,9
Recolección: liviana	-	724,7	763,7

El incremento en la concentración de isopentanol de la solución inicial hasta la fase de vapor se ilustra en la tabla que sigue.

	Destilaciones de Isopentanol		
	5 g/L	15 g/L	40 g/L

Concentración en	7x	17x	10x
fase de vapor			

Ejemplo 28: Enriquecimiento mediante destilación al vacío

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de soluciones acuosas de isopropanol mediante destilación al vacío.

El dispositivo para la destilación constó de un recipiente de reacción de 3 cuellos, un condensador refrigerado con agua y un matraz de recolección. Durante cada destilación, se usó una manta de calentamiento eléctrico para calentar el recipiente de reacción; se usó un baño de recirculación para enfriar el condensador con agua entre 3 y 5 °C; y una bomba de vacío mantuvo un vacío de aproximadamente 50 mBar. Se colocaron termómetros para medir la temperatura de la solución de reacción y la temperatura del baño de agua. Se tomaron muestras del matraz de recolección y del recipiente de reacción una vez que se recolectó un volumen buscado de 1 a 5 ml. Se realizaron tres destilaciones con soluciones acuosas de isopropanol de aproximadamente 5, 15 y 40 g/L.

Durante la destilación de la solución de 5 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 35,0 °C. Se recolectó 3,3 ml de material de fase única. Se concentró 5,0 g/L del material inicial 25 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. Durante la destilación de la solución de 15 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 34,7 °C. Se recolectó 5 ml de material de fase única. Se concentró 14,9 g/L del material inicial 12 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope. Durante la destilación de la solución de 40 g/L, la condensación comenzó a una temperatura del líquido de 33,3

°C. Se recolectó 8,1 ml de material de fase única. Se concentró 49,2 g/L del material inicial 7 veces en el material de la fase de vapor condensado de tope.

La concentración de isopropanol (g/L) de varias soluciones durante las 3 destilaciones de isopropanol se resume en la tabla que sigue.

	Destilaciones de Isopropanol		
	5 g/L	15 g/L	40 g/L
Solución de inicio	5,0	14,9	49,2
Depósito final	3,8	12,3	31,9
Recolección: pesada	126,3	184,2	347,5
Recolección: liviana	-	-	-

El incremento en la concentración de isopropanol de la solución inicial hasta la fase de vapor se ilustra en la tabla que sigue.

	Destilaciones de Isopropanol		
	5 g/L	15 g/L	40 g/L
Concentración en fase de vapor	25x	12x	7x

Ejemplo 29: Enriquecimiento mediante destilación al vacío

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento de isobutanol acuoso insaturado mediante destilación.

Se usó un dispositivo de destilación de vidrio con una columna de reflujo empacada con perlas. La destilación se realizó en dos partes, se extrajo el vacío y se enfrió el depósito entre las partes. Durante la destilación, se usó una manta de calentamiento para calentar el depósito de reacción; un agitador mantuvo bien mezclado el depósito de reacción; se usó un baño de recirculación para enfriar el condensador; una bomba de vacío mantuvo un vacío de aproximadamente 75 mBar absoluto en el sistema; y se usó una trampa de alcohol/hielo seco corriente abajo del condensador. Se colocaron termómetros para medir la temperatura del depósito de reacción, la temperatura del vapor sobre la columna de reflujo y la temperatura del baño de agua.

Durante las destilaciones, una válvula de muestra permitió la recolección desde arriba de la columna de reflujo o la redirección del flujo del condensado a través de un divisor sobre la columna de reflujo. Se recolectó el material cuando se observó buen reflujo y toda la columna estaba activa. El material inicial fue una solución de isobutanol de fase única recolectada mediante evaporación al vacío a partir de una fermentación a una escala de 400L de GEVO 1780. La condensación se observó la parte inferior de las bobinas del condensador no bien se había generado vacío con una temperatura del depósito de destilación de 22 °C y una temperatura de vapor de 16 °C. Cuando se observó reflujo adecuado a una temperatura del depósito de 31 °C y una temperatura de vapor de 20 °C, comenzó la recolección del destilado. Después de recolectar 840 mL, se interrumpió la

destilación y se tomaron muestras del depósito de destilación. El isobutanol en el depósito de destilación se redujo a una concentración de 17 g/L que es 27,9% de la cantidad inicial.

Durante la segunda parte de la destilación, se observó condensación no bien se generó vacío. Se alcanzó una temperatura máxima del depósito de reacción de 40 °C y una temperatura del vapor de 26 °C. Estas condiciones redujeron adicionalmente la concentración de isobutanol en el depósito de reacción de 17 g/L a 1,5 g/L. Al finalizar la destilación, se recolectó el 62,2% del isobutanol inicial en el depósito de destilación como destilado de fase liviana y 14,3% como destilado de fase pesada; se recolectó 15,4% como fase liviana en la trampa de hielo al vacío y 2,7% como fase pesada en la trampa de hielo al vacío y se dejó atrás el 2,2% en el depósito de destilación. En total, el incremento de la concentración del material inicial a la fase de vapor fue de 5,0 veces.

Ejemplo 30: Extracción de agua de la fase rica en alcohol

Este ejemplo ilustra la extracción efectiva de agua de la fase rica en alcohol (fase liviana) mediante destilación.

Se usó un dispositivo de destilación de vidrio con una columna de reflujo empacada con perlas. La destilación se realizó en dos partes, se extrajo el vacío y se enfrió el depósito entre las partes. Durante la destilación, se usó una manta de calentamiento para calentar el depósito de reacción; un agitador mantuvo bien mezclado el depósito de reacción; se usó un baño de recirculación para enfriar el condensador y el agitador; una bomba de vacío mantuvo un vacío de aproximadamente 75 mBar absoluto en el sistema; y se usó una trampa de alcohol/hielo seco corriente abajo del condensador. Se colocaron termómetros para

medir la temperatura del depósito de reacción, la temperatura del vapor sobre la columna de reflujo y la temperatura del baño de agua. Durante las destilaciones, una válvula de muestra permitió la recolección desde arriba de la columna de reflujo o la redirección del flujo del condensado a través de un divisor sobre la columna de reflujo. Se recolectó el material cuando se observó buen reflujo y toda la columna estaba activa.

Se combinó la fase liviana (fase rica en alcohol) de 3 fermentaciones de Gevo diferentes. Se observó buen reflujo a una temperatura del depósito de reacción de 27 °C y una temperatura del vapor de 18,5 °C; en ese momento, comenzó la recolección. Después de recolectar 580 mL, se interrumpió la destilación. El líquido del depósito de destilación era del 1,44 % en peso de agua en ese punto. La destilación se retomó y, después de alcanzar una temperatura máxima del líquido de 48 °C y una temperatura del vapor de 36,5 °C, la destilación finalizó. La solución del depósito de reacción final se secó al 0,3671% en peso de agua. El porcentaje en peso de agua en el depósito de destilación se redujo 40 veces.

Ejemplo 31: Impacto de la temperatura sobre la composición de la fase liviana y la fase pesada.

Este ejemplo ilustra la solubilidad mutua del isobutanol y el agua como una función de la temperatura.

Primero se mezclaron 20 g de agua con 20 g de isobutanol en frascos cerrados a temperatura ambiente. Los frascos se mezclaron luego a 5, 10, 20, 40, 60 ó 80 °C. Los frascos se mantuvieron a la temperatura establecida al tiempo que se mezclaron hasta establecer el equilibrio. Luego se separaron las muestras en fase liviana y fase pesada mientras se mantenía la temperatura. Las muestras de la fase

liviana y fase pesada se analizaron mediante HPLC y mediante titulación Karl-Fischer. Los resultados se presentan en la Tabla 31,1 y muestran que las concentraciones de isobutanol en cada fase dependen de la temperatura.

La Tabla 31,2 resume los datos bibliográficos para la solubilidad del butanol normal (n-butanol) en agua a varias temperaturas. Como se esperó, la solubilidad del isobutanol es similar a la del n-butanol y muestra similar dependencia de la temperatura.

Tabla 31,1: Composición de la fase liviana y de la fase pesada de isobutanol-agua a varias temperaturas

	Fase liviana		Fase pesada	
Temperatura	Isobutanol	H ₂ O	Isobutanol	H ₂ O
°C	% p	% p	% p	% p
5	83,9	16,1	11,7	88,3
10	84,0	16,0	10,6	89,4
20	83,4	16,6	11,2	88,8
40	81,5	18,5	9,24	90,8
60	79,1	20,9	7,90	92,1
80	76,5	23,5	6,04	94,0

Tabla 31,2: solubilidad de n-butanol en agua a varias temperaturas

	Fase pesada	Fase liviana
Temperatura	Butanol	Butanol
°C	% p	% p

5	9,55	80,38
10	8,91	80,33
15	8,21	80,14
20	7,81	79,93
25	7,35	79,73
30	7,08	79,38
35	6,83	78,94
40	6,6	78,59
50	6,46	77,58
60	5,62	76,38
70	6,73	74,79
80	6,89	73,53

Ejemplo 32: Fermentación por lote por alta productividad volumétrica

Este ejemplo ilustra una fermentación por lote usando un biocatalizador con alta productividad volumétrica. GEVO 1780 es un biocatalizador bacteriano modificado que contiene genes en dos plásmidos que codifican un pasaje de enzimas que convierten piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador GEVO 1780 entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Dos recipientes de fermentación DasGip de 400 mL que contenían 200 mL cada uno de medio M9 modificado formado por 85 g/L de glucosa, 20 g/L de extracto de levadura, 20 µM de citrato férrico 5,72 mg/L de H₃BO₃, 3,62 mg/L de MnCl₂·4H₂O, 0,444 mg/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,78 mg/L de Na₂MnO₄·2H₂O, 0,158 mg/L de CuSO₄·5H₂O, 0,0988 mg/L de CoCl₂·6H₂O, 6,0 g/L de NaHPO₄, 3,0 g/L de

KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl, 2,0 g/L de NH_4Cl , 0,0444 g/L de MgSO_4 y 0,00481 g/L de CaCl_2 se inocularon con células de GEVO 1780 de reservas congeladas. Los recipientes de fermentación se ajustaron a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. Los recipientes se agitaron con agitación mínima de 300 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 50% usando un inyector de aire de 12 sL/h hasta que la OD_{600} alcanzó alrededor de 1,0. Los recipientes se indujeron luego con 0,1 mM de IPTG. Los recipientes funcionaron bajo estas condiciones durante alrededor de 12 horas. A alrededor de 12 horas, los contenidos de los recipientes de fermentación se vertieron en botellas plásticas graduadas de 500 ml y se centrifugaron durante 20 minutos a 4500 rpm. Las células se resuspendieron en un volumen total de 50 ml de medio M9 modificado. Un recipiente DasGip de 400 ml que contenía 150 ml de medio M9 modificado se inoculó con 50 ml del medio que contenía las células y luego se indujo con 0,1 mM de IPTG. El contenido de oxígeno disuelto constante del 5% se mantuvo usando inyección de aire de 2,5 sL/h con agitación variable controlada automáticamente de 300 a 1200 rpm. Se realizó la medición continua del gas descargado del recipiente de fermentación mediante análisis GC-MS en cuanto al oxígeno, isobutanol, etanol, dióxido de carbono y nitrógeno en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en el transcurso del experimento y se usaron para medir la OD_{600} , la concentración de glucosa mediante HPLC y la concentración de isobutanol mediante GC. La producción del isobutanol alcanzó el máximo a alrededor de 22 horas con una concentración por lote de alrededor de 22 g/L y con un rendimiento teórico máximo de aproximadamente 80%. La productividad

volumétrica de la fermentación, calculada cuando el isobutanol estaba en una concentración entre 1 g/L y 15 g/L, fue de alrededor de 2,3 g/L/h.

Ejemplo 33: Fermentación por lote por alta productividad volumétrica

Este ejemplo ilustra una fermentación por lote usando un biocatalizador con alta productividad volumétrica. El biocatalizador Gevol530 modificado se transformó con los dos plásmidos pSA69 y pSA55, que codifican un pasaje de enzimas que convierten el piruvato en isobutanol. Cuando el biocatalizador Gevol530 (pSA69, pSA55) entró en contacto con glucosa en un medio adecuado para el desarrollo del biocatalizador, a alrededor de 30 °C, el biocatalizador produjo isobutanol a partir de la glucosa. Dos recipientes de fermentación DasGip de 400 mL que contenían 200 mL cada uno de medio rico en EZ (Neidhardt, F. C, P. L. Bloch, y D. F. Smith. 1974. *Culture Medium for Enterobacteria*. *J Bacteriol.* 119:736-47) que contenía 72 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura se inocularon con células de Gevol530 (pSA69, pSA55). Los recipientes se ajustaron a un sistema de control por computadora para monitorear y controlar el pH a 6,5 a través de adición de base, temperatura a alrededor de 30 °C, oxígeno disuelto y agitación. Los recipientes se agitaron con agitación mínima de 300 rpm y la agitación varió para mantener un contenido de oxígeno disuelto de alrededor del 50% usando un inyector de aire de 12 sL/h hasta que la OD₆₀₀ alcanzó alrededor de 1,0. Los recipientes se indujeron luego con 0,1 mM de IPTG. Los recipientes funcionaron bajo estas condiciones durante alrededor de 11 horas. A alrededor de 11 horas, los contenidos de los recipientes de fermentación se vertieron en botellas plásticas graduadas de 500 ml y se centrifugaron durante 20 minutos a 4500 rpm. Las células se resuspendieron en un volumen total de 50 ml de medio M9 modificado. Un recipiente DasGip de 400 ml

que contenía 150 ml de medio rico en EZ que contenía 72 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura se inoculó con 50 ml del medio que contenía las células y luego se indujo con 0,1 mM de IPTG. La concentración celular era de aproximadamente 6 g de CDW por L. El contenido de oxígeno disuelto constante del 5% se mantuvo usando inyección de aire de 2,5 sL/h con agitación variable controlada automáticamente de 300 a 1200 rpm. Se realizó la medición del gas descargado del recipiente de fermentación mediante trampa de burbuja de octanol y luego se realizó la medición mediante GC en cuanto al isobutanol y el etanol. También se realizó la medición continua de las concentraciones del gas descargado de dióxido de carbono y nitrógeno mediante un analizador DasGip en el transcurso del experimento. Las muestras se extrajeron de manera aséptica del recipiente de fermentación en el transcurso del experimento y se usaron para medir la OD_{600} , la concentración de glucosa mediante HPLC y la concentración de isobutanol en el caldo mediante GC. La producción del isobutanol alcanzó el máximo a alrededor de 4 horas con una concentración por lote de 15 g/L y con un rendimiento teórico máximo de aproximadamente 86%. La productividad volumétrica de la fermentación, calculada a partir del comienzo de la fermentación en tiempo cero hasta un tiempo de fermentación transcurrido de alrededor de 4 horas, fue de alrededor de 3,5 g/L/h.

Ejemplo 34: Enriquecimiento por contacto con un adsorbente de agua

Este ejemplo ilustra el enriquecimiento del isobutanol a partir de soluciones acuosas de isobutanol usando tamices moleculares para adsorber el agua. Se preparó una solución subsaturada de isobutanol en agua. Se mezclaron completamente 2 g de esta solución con 1,5 g de partículas de tamices moleculares de 3 Ångstrom en un frasco. Después de mezclar, el frasco se dejó reposar. Se

observaron 3 fases: una fase sólida que contenía las partículas de tamices moleculares y dos fases líquidas que comprendían una fase superior, liviana, rica en isobutanol, y una fase inferior, pesada, deficiente en isobutanol.

REIVINDICACIONES

1. Un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de un caldo de fermentación que comprende microorganismos y el alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

a. incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del caldo de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción;

b. formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la porción del caldo de fermentación; y

c. separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación es inferior a alrededor de 9/91 (p/p).

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación es inferior a alrededor de 6/94 (p/p).

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación es inferior a alrededor de 3/97 (p/p).

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad se selecciona del grupo conformado por:

a. adición de un soluto hidrófilo;

b. destilación de una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6;

- c. osmosis inversa;
- d. diálisis;
- e. adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo de alcohol;
- f. extracción del alcohol C3-C6 en un extractor selectivo de alcohol;
- g. adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo de agua; y
- h. extracción de agua en un extractor selectivo de agua.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es propanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a alrededor de 0,2 (p/p).

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es butanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a alrededor de 1 (p/p).

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es pentanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a alrededor de 4 (p/p).

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 se selecciona del grupo conformado por propanol, butanol, pentanol y hexanol.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es propanol.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADO porque el propanol se selecciona del grupo conformado por 1-propanol y 2-propanol.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es butanol.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque el butanol se selecciona del grupo conformado por 1-butanol, 2-butanol, ter-butanol (2-metil-2-propanol) e isobutanol (2-metil-1-propanol).

14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque el butanol es isobutanol (2-metil-1-propanol).

15. El método de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es pentanol.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADO porque el pentanol se selecciona del grupo conformado por 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol y 2,2-dimetil-1-propanol.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es hexanol.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque el hexanol se selecciona del grupo conformado por 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol y 2 etil-1-butanol.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende, además, enfriar la fase rica en alcohol C3-C6 para incrementar la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende, además, recuperar el alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol C3-C6 mediante un proceso seleccionado del grupo conformado por destilación, diálisis, adsorción de agua, extracción del alcohol C3-C6 mediante extracción por solvente, contacto con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua y contacto con un compuesto hidrófilo para producir una primera fase que comprende el alcohol C3-C6 y agua y una segunda fase que comprende alcohol C3-C6, en donde la relación del agua con respecto al alcohol C3-C6 en la segunda fase es menor que en la primera fase.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque la segunda fase comprende al menos alrededor del 90% en peso de alcohol C3-C6.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque la segunda fase comprende al menos alrededor del 95% en peso de alcohol C3-C6.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque la segunda fase comprende al menos alrededor del 99% en peso de alcohol C3-C6.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque el paso de recuperación comprende destilar la fase rica en alcohol C3-C6, en donde la primera fase comprende una fase de vapor que comprende alcohol C3-C6 y agua y en donde la segunda fase comprende un producto de alta ebullición que comprende alcohol C3-C6.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende, además, combinar el caldo de fermentación con la fase rica en agua del paso (c) o el producto de alta ebullición de acuerdo con la reivindicación 24, antes del paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende, además, después del paso de incrementar la actividad, conducir la porción restante de la solución acuosa diluida hasta un recipiente de fermentación.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la porción restante comprende una impureza, dicho método CARACTERIZADO porque comprende, además, extraer al menos una porción de la impureza de al menos una porción de la porción restante antes del paso de conducción.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el caldo de fermentación comprende una impureza y la relación de la impureza con respecto al alcohol C3-C6 en la fase líquida rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación en la fase rica en agua.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6, y condensar la fase de vapor y dicho método comprende, además, tratar la porción del caldo de fermentación para la extracción del agua antes del paso de destilación o de manera simultánea con el mismo mediante un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. extracción selectiva del agua;
- b. unión selectiva del agua; y

c. rechazo selectivo del agua.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6, y condensar la fase de vapor y dicho método comprende, además, tratar la porción del caldo de fermentación para la extracción del agua antes del paso de destilación o de manera simultánea con el mismo mediante un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. adición de un soluto hidrófilo;
- b. adición de una fuente de carbono;
- c. osmosis inversa;
- d. diálisis;
- e. adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo de alcohol;
- f. extracción del alcohol C3-C6 en un extractor selectivo de alcohol;
- g. adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo de agua; y
- h. extracción de agua en un extractor selectivo de agua.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6, y condensar la fase de vapor, y dicho método comprende, además, tratar la fase rica en alcohol C3-C6 para la extracción del agua mediante un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. extracción selectiva del agua;
- b. unión selectiva del agua; y

c. rechazo selectivo del agua.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6, y condensar la fase de vapor, y dicho método comprende, además, tratar la fase rica en alcohol C3-C6 para la extracción del agua mediante un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. adición de un soluto hidrófilo;
- b. adición de una fuente de carbono;
- c. osmosis inversa;
- d. diálisis;
- e. adsorción del butanol sobre un adsorbente selectivo de alcohol;
- f. extracción del butanol en un extractor selectivo de alcohol;
- g. adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo de agua; y
- h. extracción de agua en un extractor selectivo de agua.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el caldo de fermentación por al menos alrededor de 5 veces.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad comprende destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6, y condensar la fase de vapor.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el paso de destilación se realiza por debajo de la presión atmosférica y a una temperatura de entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, CARACTERIZADO porque el paso de destilación se realiza en un recipiente de destilación.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, CARACTERIZADO porque la porción del caldo de fermentación se encuentra a una temperatura que oscila entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C antes de la introducción en el recipiente de destilación.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 37, CARACTERIZADO porque la porción del caldo de fermentación se somete a una presión por debajo de la atmosférica en el recipiente de destilación.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 38, CARACTERIZADO porque comprende, además, después del paso de destilación, conducir la porción restante del caldo de fermentación desde el recipiente de destilación hasta un recipiente de fermentación.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 39, CARACTERIZADO porque el recipiente de fermentación se encuentra a presión atmosférica.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 39, CARACTERIZADO porque el recipiente de fermentación se encuentra por debajo de la presión atmosférica.

42. El método de acuerdo con la reivindicación 39, CARACTERIZADO porque el recipiente de fermentación se encuentra por sobre la presión atmosférica.

43. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el paso de destilación se realiza a una presión que abarca desde alrededor de 0,025 bar hasta alrededor de 10 bar.

44. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el paso de destilación se realiza en un recipiente de fermentación.

45. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 se selecciona del grupo conformado por propanoles, butanoles, pentanoles y hexanoles.

46. El método de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es propanol.

47. El método de acuerdo con la reivindicación 46, CARACTERIZADO porque el propanol se selecciona del grupo conformado por 1-propanol y 2-propanol.

48. El método de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es butanol.

49. El método de acuerdo con la reivindicación 48, CARACTERIZADO porque el butanol se selecciona del grupo conformado por 1-butanol, 2-butanol, ter-butanol (2-metil-2-propanol) e isobutanol (2-metil-1-propanol).

50. El método de acuerdo con la reivindicación 48, CARACTERIZADO porque el butanol es isobutanol (2 -metil- 1 - propanol).

51. El método de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es pentanol.

52. El método de acuerdo con la reivindicación 51, CARACTERIZADO porque el pentanol se selecciona del grupo conformado por 1-pentanol, 2-pentanol, 3-

pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol.

53. El método de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es hexanol.

54. El método de acuerdo con la reivindicación 53, CARACTERIZADO porque el hexanol se selecciona del grupo conformado por 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol y 2 etil-1-butanol.

55. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque comprende, además, enfriar la fase rica en alcohol C3-C6 para incrementar la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6.

56. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque comprende, además, recuperar alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol C3-C6 mediante un proceso seleccionado del grupo conformado por destilación, diálisis, adsorción de agua, extracción del alcohol C3-C6 mediante extracción por solvente, contacto con un líquido hidrocarburo que es inmisible en agua y contacto con un compuesto hidrófilo para producir una primera fase que comprende alcohol C3-C6 y agua y una segunda fase que comprende alcohol C3-C6, en donde la relación del agua con respecto al alcohol C3-C6 en la segunda fase es menor que en la primera fase.

57. El método de acuerdo con la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque la segunda fase comprende al menos alrededor del 90% en peso de alcohol C3-C6.

58. El método de acuerdo con la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque la segunda fase comprende al menos alrededor del 95% en peso de alcohol C3-C6.

59. El método de acuerdo con la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque la segunda fase comprende al menos alrededor del 99% en peso de alcohol C3-C6.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque el paso de recuperación comprende destilar la fase rica en alcohol C3-C6, en donde la primera fase comprende una fase de vapor que comprende alcohol C3-C6 y agua y en donde la segunda fase comprende un producto de alta ebullición que comprende alcohol C3-C6.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque la fase de vapor comprende un azeótropo de agua y el alcohol C3-C6.

62. El método de acuerdo con la reivindicación 61, CARACTERIZADO porque la relación de alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación en el azeótropo.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende, además, procesar la fase rica en alcohol C3-C6.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 63, CARACTERIZADO porque el paso de procesamiento se selecciona del grupo conformado por:

a. destilar el alcohol C3-C6 sustancialmente puro de la fase rica en alcohol C3-C6;

b. destilar un azeótropo de alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol C3-C6;

c. poner en contacto la fase rica en alcohol C3-C6 con un adsorbente selectivo de alcohol C3-C6;

- d. convertir el alcohol C3-C6 en la fase rica en alcohol C3-C6 en una olefina; y
- e. combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua.

65. El método de acuerdo con la reivindicación 63, CARACTERIZADO porque el paso de procesamiento comprende combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua y la combinación forma una única fase uniforme.

66. El método de acuerdo con la reivindicación 63, CARACTERIZADO porque el paso de procesamiento comprende combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua y la combinación forma una fase liviana y una fase pesada en donde la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase liviana es superior a la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase pesada.

67. Un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de un caldo de fermentación que comprende microorganismos y el alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

- a. reducir la actividad del agua en una porción del caldo de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en la porción;
- b. formar una fase líquida rica en agua y una fase rica en alcohol C3-C6 a partir de la porción del caldo de fermentación; y
- c. separar la fase rica en agua y la fase rica en alcohol C3-C6.

68. Un método para producir un alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

a. cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6;

b. incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del medio de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en el medio de fermentación;

c. formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase rica en agua a partir de la porción del medio de fermentación;

d. separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua; y

e. conducir la fase rica en agua hasta el medio de fermentación en el paso a.

69. El método de acuerdo con la reivindicación 68, CARACTERIZADO porque el paso de cultivo es un proceso seleccionado del grupo conformado por:

a. fermentación por lote,

b. fermentación por lote alimentado,

c. fermentación continua,

d. fermentación con reciclado celular, y

e. proceso de reacción enzimática.

70. El método de acuerdo con la reivindicación 68, CARACTERIZADO porque el microorganismo se selecciona del grupo conformado por *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutyllicum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* y *Clostridium beijerinckii*.

71. El método de acuerdo con la reivindicación 68, CARACTERIZADO porque el microorganismo es un microorganismo resistente a la temperatura.

72. El método de acuerdo con la reivindicación 71, CARACTERIZADO porque el microorganismo es viable a temperaturas que abarcan desde alrededor de 20 °C hasta alrededor de 95 °C.

73. El método de acuerdo con la reivindicación 72, CARACTERIZADO porque el microorganismo tiene una productividad al menos de alrededor de 0,5 g/L por hora.

74. Un método para producir un alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

a. hidrolizar una carga de alimentación que comprende un polisacárido y al menos otro compuesto para producir productos de hidrólisis fermentables;

b. fermentar al menos una porción de los productos de hidrólisis fermentables en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6, en donde el medio de fermentación comprende, además, al menos un compuesto no fermentado;

c. incrementar la actividad del alcohol C3-C6 de una porción del medio de fermentación hasta al menos la de saturación del alcohol C3-C6 en el medio de fermentación;

d. formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase rica en agua a partir de la porción del medio de fermentación;

e. separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua; y

f. separar dicho al menos un compuesto no fermentado del medio de fermentación, la fase rica en agua o ambos.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 74, CARACTERIZADO porque el paso de hidrolización comprende sacarificación.

76. El método de acuerdo con la reivindicación 74, CARACTERIZADO porque al menos dos de los pasos seleccionados entre hidrolización, fermentación e incremento de la actividad del alcohol C3-C6 se realizan de manera simultánea durante al menos un lapso de tiempo.

77. El método de acuerdo con la reivindicación 74, CARACTERIZADO porque el paso de fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de hidrolizar la carga de alimentación.

78. Un método para producir un producto a partir de un alcohol C3-C6 en un caldo de fermentación que comprende microorganismos y el alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

- a. destilar una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 a partir del caldo de fermentación;
- b. hacer reaccionar el alcohol C3-C6 en la fase de vapor para formar el producto.

79. El método de acuerdo con la reivindicación 78, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es propanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase de vapor es superior a alrededor de 0,2 (p/p).

80. El método de acuerdo con la reivindicación 78, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es butanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase de vapor es superior a alrededor de 1 (p/p).

81. El método de acuerdo con la reivindicación 78, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es pentanol y la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase de vapor es superior a alrededor de 4 (p/p).

82. El método de acuerdo con la reivindicación 78, CARACTERIZADO porque el paso de reacción se realiza en presencia de un catalizador.

83. El método de acuerdo con la reivindicación 82, CARACTERIZADO porque el catalizador es un catalizador heterogéneo.

84. Un método para producir un alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

a. cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir el alcohol C3-C6;

b. incrementar la actividad del alcohol C3-C6 en una porción del medio de fermentación;

c. destilar la porción del medio de fermentación para producir una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6 y una fase líquida, y

d. conducir la fase líquida hasta el medio de fermentación.

85. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la porción del medio de fermentación en el paso b es inferior a alrededor de 7,5/92,5 (p/p).

86. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la porción del medio de fermentación en el paso b es inferior a alrededor de 5,0/95 (p/p).

87. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 en la porción del medio de fermentación en el paso b es inferior a alrededor de 2,5/97,5 (p/p).

88. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad se selecciona del grupo conformado por:

- a. adición de un soluto hidrófilo;
- b. destilación de una fase de vapor que comprende agua y alcohol C3-C6
- c. osmosis inversa;
- d. diálisis;
- e. adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo de alcohol;
- f. extracción del alcohol C3-C6 en un extractor selectivo de alcohol;
- g. adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo de agua; y
- h. extracción de agua en un extractor selectivo de agua.

89. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 se selecciona del grupo conformado por propanol, butanol, pentanol y hexanol.

90. El método de acuerdo con la reivindicación 89, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es propanol.

91. El método de acuerdo con la reivindicación 90, CARACTERIZADO porque el propanol se selecciona del grupo conformado por 1-propanol y 2-propanol.

92. El método de acuerdo con la reivindicación 89, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es butanol.

93. El método de acuerdo con la reivindicación 92, CARACTERIZADO porque el butanol se selecciona del grupo conformado por 1-butanol, 2-butanol, ter-butanol (2-metil-2-propanol) e isobutanol (2-metil-1-propanol).

94. El método de acuerdo con la reivindicación 92, CARACTERIZADO porque el butanol s isobutanol (2-metil-1-propanol).

95. El método de acuerdo con la reivindicación 89, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es pentanol.

96. El método de acuerdo con la reivindicación 95, CARACTERIZADO porque el pentanol se selecciona del grupo conformado por 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol.

97. El método de acuerdo con la reivindicación 89, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es hexanol.

98. El método de acuerdo con la reivindicación 97, CARACTERIZADO porque el hexanol se selecciona del grupo conformado por 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol y 2-etil-1-butanol.

99. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la fase líquida comprende una impureza y dicho método comprende, además, extraer al menos una porción de la impureza de al menos una porción de la fase líquida antes del paso de conducción.

100. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad del alcohol C3-C6 comprende un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. extracción selectiva del agua;
- b. unión selectiva del agua; y
- c. rechazo selectivo del agua.

101. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el paso de incrementar la actividad se selecciona del grupo conformado por:

- a. adición de un soluto hidrófilo;
- b. adición de una fuente de carbono;
- c. osmosis inversa;
- d. diálisis;
- e. adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo; y
- f. adsorción de agua sobre un adsorbente selectivo.

102. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque comprende, además, el paso de condensar la fase de vapor para formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua y separar la fase rica en alcohol C3-C6 de la fase rica en agua.

103. El método de acuerdo con la reivindicación 102 CARACTERIZADO porque comprende, además, tratar la fase rica en alcohol C3-C6 para la extracción del agua mediante un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. extracción selectiva del agua;
- b. unión selectiva del agua; y
- c. rechazo selectivo del agua.

104. El método de acuerdo con la reivindicación 102, CARACTERIZADO porque comprende, además, tratar la fase rica en alcohol C3-C6 para la extracción del agua mediante un paso seleccionado del grupo conformado por:

- a. adición de un soluto hidrófilo;
- b. adición de una fuente de carbono;
- c. osmosis inversa;
- d. diálisis;
- e. adsorción del alcohol C3-C6 sobre un adsorbente selectivo de alcohol;
- f. extracción del alcohol C3-C6 en un extractor selectivo de alcohol;
- g. adsorción de agua sobre adsorbente selectivo de agua; y
- h. extracción de agua en un extractor selectivo de agua.

105. El método de acuerdo con la reivindicación 102, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase rica en alcohol C3-C6 es superior a la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en el medio de fermentación por al menos alrededor de 5 veces.

106. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el paso de destilación se realiza por debajo de la presión atmosférica y a una temperatura que oscila entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C.

107. El método de acuerdo con la reivindicación 106, CARACTERIZADO porque la porción del medio de fermentación comprende microorganismos y en donde el paso de destilación se realiza en un recipiente de destilación.

108. El método de acuerdo con la reivindicación 107, CARACTERIZADO porque la porción del medio de fermentación se encuentra a una temperatura que oscila entre alrededor de 20 °C y alrededor de 95 °C antes de la introducción en el recipiente de destilación.

109. El método de acuerdo con la reivindicación 107, CARACTERIZADO porque la porción del medio de fermentación se somete a una presión por debajo de la presión atmosférica en el recipiente de destilación.

110. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la fermentación se realiza a presión atmosférica.

111. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la fermentación se realiza a una presión por debajo de la presión atmosférica.

112. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la fermentación se realiza a una presión por encima de la presión atmosférica.

113. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el paso de destilación se realiza a una presión que abarca desde alrededor de 0,025 bar hasta alrededor de 10 bar.

114. El método de acuerdo con la reivindicación 102 CARACTERIZADO porque comprende, además, el paso de enfriar la fase rica en alcohol C3-C6 para incrementar la relación del alcohol C3-C6 en la fase rica en alcohol C3-C6.

115. El método de acuerdo con la reivindicación 102, CARACTERIZADO porque comprende, además, recuperar alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol C3-

C6 mediante un proceso seleccionado del grupo conformado por destilación, diálisis, adsorción de agua, extracción del alcohol C3-C6 mediante extracción por solvente, contacto con un líquido hidrocarburo que es inmisible en agua y contacto con un compuesto hidrófilo para producir una primera fase que comprende alcohol C3-C6 y agua y una segunda fase que comprende alcohol C3-C6, en donde la relación del agua con respecto al alcohol C3-C6 en la segunda fase es menor que en la primera fase.

116. El método de acuerdo con la reivindicación 115, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 recuperado comprende al menos alrededor del 90% en peso de alcohol C3-C6.

117. El método de acuerdo con la reivindicación 115, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 recuperado comprende al menos alrededor del 95% en peso de alcohol C3-C6.

118. El método de acuerdo con la reivindicación 115, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 recuperado comprende al menos alrededor del 99% en peso de alcohol C3-C6.

119. El método de acuerdo con la reivindicación 115, CARACTERIZADO porque el paso de recuperación comprende destilar la fase rica en alcohol C3-C6 para producir una fase de vapor que comprende alcohol C3-C6 y agua y un producto de alta ebullición que comprende el alcohol C3-C6.

120. El método de acuerdo con la reivindicación 119, CARACTERIZADO porque el producto de alta ebullición comprende al menos alrededor del 90% en peso de alcohol C3-C6.

121. El método de acuerdo con la reivindicación 119, CARACTERIZADO porque el producto de alta ebullición comprende al menos alrededor del 95% en peso de alcohol C3-C6.

122. El método de acuerdo con la reivindicación 119, CARACTERIZADO porque el producto de alta ebullición comprende al menos alrededor del 99% en peso de alcohol C3-C6.

123. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la fase de vapor comprende un azeótropo de agua y alcohol C3-C6.

124. El método de acuerdo con la reivindicación 102, CARACTERIZADO porque comprende, además, procesar la fase rica en alcohol C3-C6.

125. El método de acuerdo con la reivindicación 124, CARACTERIZADO porque el paso de procesamiento se selecciona del grupo conformado por:

- a. destilar alcohol C3-C6 sustancialmente puro de la fase rica en alcohol C3-C6;
- b. destilar un azeótropo del alcohol C3-C6 de la fase rica en alcohol C3-C6;
- c. poner en contacto la fase rica en alcohol C3-C6 con un adsorbente selectivo de alcohol C3-C6; y
- d. combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua.

126. El método de acuerdo con la reivindicación 124, CARACTERIZADO porque el paso de procesamiento comprende combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmiscible en agua y la combinación forma una única fase uniforme.

127. El método de acuerdo con la reivindicación 124, CARACTERIZADO porque el paso de procesamiento comprende combinar la fase rica en alcohol C3-C6 con un líquido hidrocarburo que es inmisible en agua y la combinación forma una fase liviana y una fase pesada en donde la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la fase liviana es mayor que en la fase pesada.

128. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el paso de cultivo es un proceso seleccionado del grupo conformado por:

- a. fermentación por lote,
- b. fermentación por lote alimentado,
- c. fermentación continua,
- d. fermentación con reciclado celular,
- e. proceso de reacción enzimática.

129. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el microorganismo se selecciona del grupo conformado por *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutlicum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* y *Clostridium beijerickii*.

130. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el microorganismo es un microorganismo resistente a la temperatura.

131. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el microorganismo es viable a temperaturas que abarcan desde alrededor de 20 °C hasta alrededor de 95 °C.

132. El método de acuerdo con la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque el microorganismo tiene una productividad al menos de alrededor de 0,5 g/L por hora.

133. Un método para recuperar un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa diluida que comprende una primera cantidad del alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

a. destilar una porción de la solución acuosa diluida a una fase de vapor que comprende alcohol C3-C6 y agua, en donde la fase de vapor comprende entre alrededor del 1% en peso y alrededor del 45% en peso de la primera cantidad de alcohol C3-C6 a partir de la porción de la solución acuosa diluida; y

b. condensar la fase de vapor.

134. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la fase de vapor comprende entre alrededor del 2% en peso y alrededor del 40% en peso del alcohol C3-C6 de la solución acuosa diluida.

135. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la fase de vapor comprende entre alrededor del 3% en peso y alrededor del 35% en peso del alcohol C3-C6 de la solución acuosa diluida.

136. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la fase de vapor comprende entre alrededor del 4% en peso y alrededor del 30% en peso del alcohol C3-C6 de la solución acuosa diluida.

137. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la fase de vapor comprende entre alrededor del 5% en peso y alrededor del 25% en peso del alcohol C3-C6 de la solución acuosa diluida.

138. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque comprende, además, formar una fase líquida rica en alcohol C3-C6 y una fase líquida rica en agua a partir de la fase de vapor condensado.

139. El método de acuerdo con la reivindicación 138 CARACTERIZADO porque comprende, además, separar la fase rica en alcohol C3-C6 y la fase rica en agua.

140. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el paso de destilación es destilación de una sola etapa.

141. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es propanol.

142. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es butanol.

143. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es pentanol.

144. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el alcohol C3-C6 es hexanol.

145. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la solución acuosa diluida es inferior a alrededor de 9/91 (p/p).

146. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la solución acuosa diluida es inferior a alrededor de 6/94 (p/p).

147. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque la relación del alcohol C3-C6 con respecto al agua en la solución acuosa diluida es inferior a alrededor de 3/97 (p/p).

148. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el paso de destilación es adiabático.

149. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el paso de destilación es isotérmico.

150. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el enriquecimiento de alcohol a partir de la solución acuosa diluida al vapor condensado es de al menos alrededor de 5 veces.

151. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el enriquecimiento de alcohol a partir de la solución acuosa diluida al vapor condensado es de al menos alrededor de 10 veces.

152. El método de acuerdo con la reivindicación 133, CARACTERIZADO porque el enriquecimiento de alcohol a partir de la solución acuosa diluida al vapor condensado es de al menos alrededor de 15 veces.

153. Un método para operar una planta de producción de etanol reestructurada que comprende una unidad de pretratamiento, múltiples unidades de fermentación, y un alambique para producir un alcohol C3-C6, CARACTERIZADO porque comprende:

a. pretratar una carga de alimentación para formar azúcares fermentables en la unidad de pretratamiento;

b. cultivar un microorganismo en un medio de fermentación que comprende los azúcares fermentables en una primera unidad de fermentación para producir el alcohol C3-C6;

c. tratar una porción del medio de fermentación que comprende el alcohol C3-C6 para extraer una porción del alcohol C3-C6;

d. devolver la porción tratada del medio de fermentación a la primera unidad de fermentación; y

e. transferir el medio de fermentación desde la primera unidad de fermentación hasta el alambique.

154. El método de acuerdo con la reivindicación 153, CARACTERIZADO porque la producción de alcohol C3-C6 de la planta reestructurada es al menos de alrededor del 80% del alcohol C3-C6 equivalente de la producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración.

155. El método de acuerdo con la reivindicación 153, CARACTERIZADO porque la producción de alcohol C3-C6 de la planta reestructurada es al menos de alrededor del 90% del alcohol C3-C6 equivalente de la producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración.

156. El método de acuerdo con la reivindicación 153, CARACTERIZADO porque la producción de alcohol C3-C6 de la reestructurada es al menos de alrededor del 95% del alcohol C3-C6 equivalente de la producción máxima de etanol de la planta antes de la reestructuración.

157. Un método de extracción de un alcohol C3-C6 a partir de una solución acuosa, CARACTERIZADO porque comprende poner en contacto la solución acuosa con un extractor ácido basado en amina selectivo de alcohol.

158. El método de acuerdo con la reivindicación 157, CARACTERIZADO porque el extractor ácido basado en amina se forma al acidificar una solución de amina orgánica.

159. El método de acuerdo con la reivindicación 157, CARACTERIZADO porque se forman dos fases después de dicho contacto.

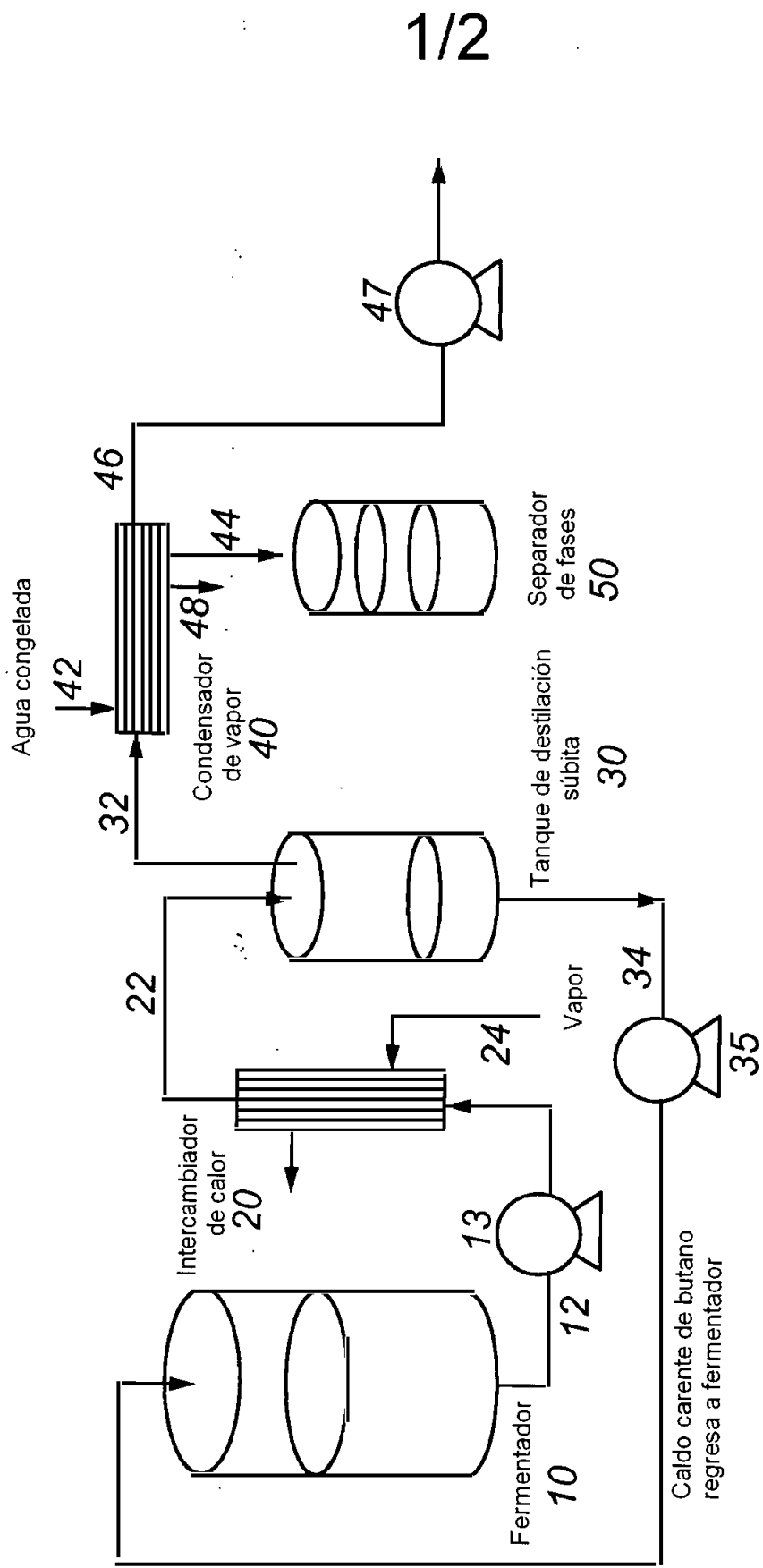


Fig. 1

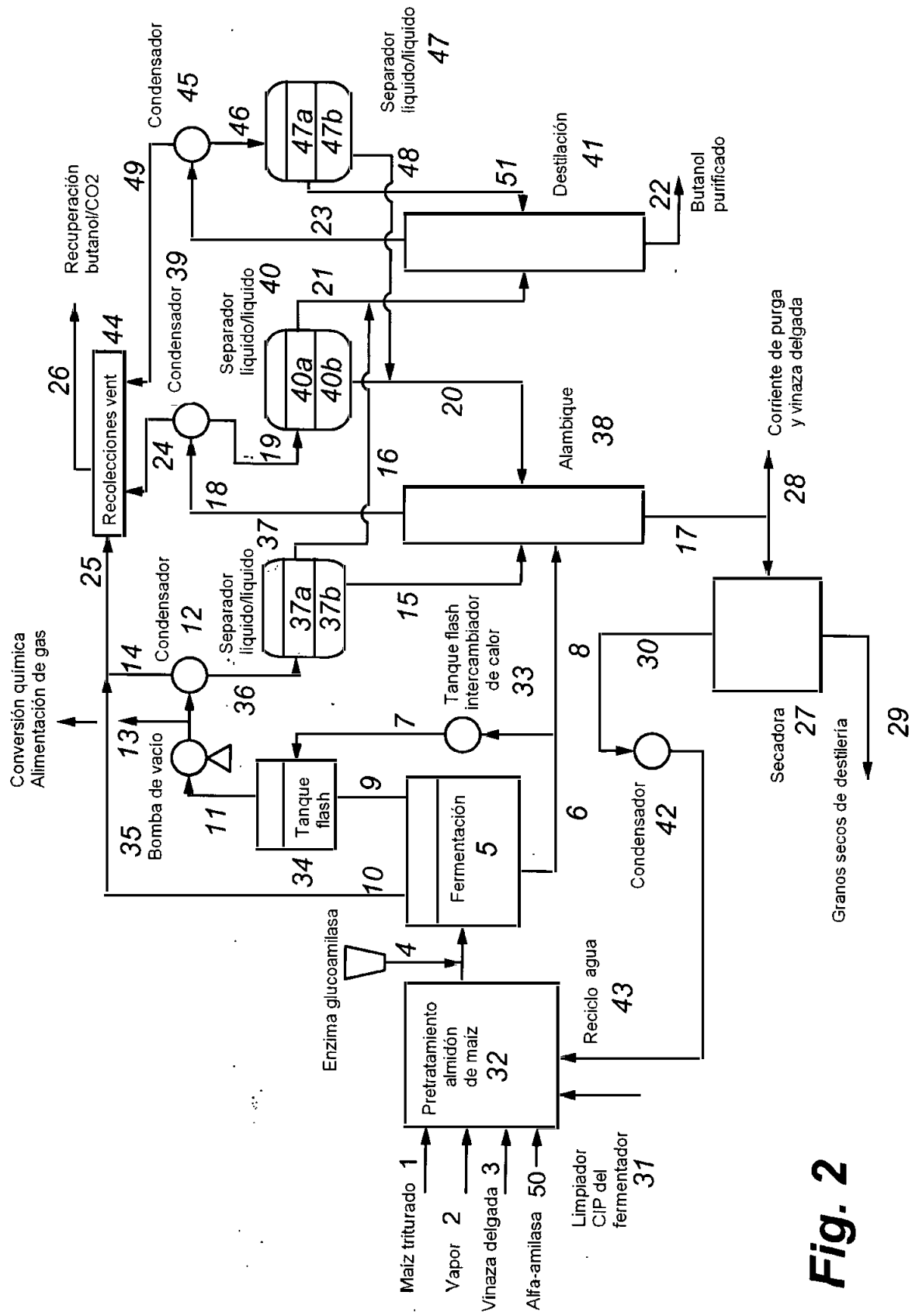


Fig. 2

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

Receiving Office use only	
PCT/US08/88187	
International Application No.	
23 DECEMBER 2008 (23.12.08)	
International Filing Date	
PCT INTERNATIONAL APPLICATION RO/US	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) 6033-1-PCT	

Box No. I TITLE OF INVENTION	
RECOVERY OF HIGHER ALCOHOLS FROM DILUTE AQUEOUS SOLUTIONS	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) GEVO, Inc. 345 Inverness Drive South Building C, Suite 310 Englewood, Colorado 80112 UNITED STATES OF AMERICA	Telephone No. (303) 858-8358
	Facsimile No. (303) 858-8431
	Applicant's registration No. with the Office N/A
☐ E-mail authorization: Marking this check-box authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, if the Office or Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application. (See also the Notes to Boxes Nos. II and III.)	E-mail address
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) SANZGIRI, Rita P. SHERIDAN ROSS P.C. 1560 Broadway, Suite 1200 Denver, Colorado 80202 UNITED STATES OF AMERICA	Telephone No. (303) 863-9700
	Facsimile No. (303) 863-0223
	Agent's registration No. with the Office 59,846
☐ E-mail authorization: Marking this check-box authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, if the Office or Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application. (See also the Notes to Boxes Nos. II and III.)	E-mail address
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) EVANKO, William A. 301 Allen Street Golden, Colorado 80401 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office N/A
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) EYAL, Arahon M. 16, Levy - Jerusalem ISRAEL	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office N/A
State (that is, country) of nationality: IL	State (that is, country) of residence: IL
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) GLASSNER, David A. 1120 W. Rowland Avenue Littleton, Colorado 80127 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office N/A
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) FUDU, Miao 219 Bayberry Drive Chester Springs, Pennsylvania 19425 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office N/A
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

ARISTIDOU, Aristos A.
10198 Alexa Lane
Highlands Ranch, Colorado 80130
UNITED STATES OF AMERICA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office
N/A

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

EVANS, Kent
5204 S. Everett Court
Littleton, Colorado 80123
UNITED STATES OF AMERICA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office
N/A

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GRUBER, Patrick R.
8800 Sage Valley Road
Longmont, Colorado 80503-8885
UNITED STATES OF AMERICA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office
N/A

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HAWKINS, Andrew C.
17377 Cornerstone Drive
Parker, Colorado 80134
UNITED STATES OF AMERICA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office
N/A

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*
 - (i) *if more than one person is to be indicated as applicant and/or inventor and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*
 - (ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*
 - (iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*
 - (iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*
 - (v) *if, in Box No. VI, there are more than four earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*
2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(i) and 49bis.1(a) or (b)).*
3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(ii) and 49bis.1(d)).*

CONTINUATION OF BOX IV:

All attorneys and agents associated with Customer Number 22442 and members of the law firm of SHERIDAN ROSS P.C. The address and telephone number is indicated in Box IV.

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a) the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ JP Japan is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 27/12/2007 27 December 2007	61/017,141	US		
item (2) 16/01/2008 16 January 2008	61/021,495	US		
item (3) 16/01/2008 16 January 2008	61/021,558	US		
item (4) 16/01/2008 16 January 2008	61/021,567	US		

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Transmit certified copy: the receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ other, see Supplemental Box

Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (_____). (See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)

Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if more than one International Searching Authority is competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA/ US

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):	Number of items
(a) on paper , the following number of sheets:	1. ☒ fee calculation sheet	: 1
request (including declaration and supplemental sheets) :	2. ☐ original separate power of attorney	:
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) :	3. ☐ original general power of attorney	:
claims :	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:
abstract :	5. ☐ statement explaining lack of signature	:
drawings :	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:
Sub-total number of sheets :	7. ☐ translation of international application into (language):	:
sequence listing :	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
tables related thereto :	9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)	:
(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :	:
Total number of sheets :	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter :	:
	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :	:
(b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i))	10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)	:
(i) ☐ sequence listing	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :	:
(ii) ☐ tables related thereto	(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :	:
(c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii))	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :	:
(i) ☐ sequence listing	11. ☐ copy of results of earlier search(es) (Rule 12bis.1(a)) :	:
(ii) ☐ tables related thereto	12. ☐ other (specify):	:
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the		
☐ sequence listing:		
☐ tables related thereto:		
(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)		
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 2	Language of filing of the international application: ENGLISH	

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

By: Rita P. Sanzgiri (23.12.08)
 RITA P. SANZGIRI, REG. NO. 59,846

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SANZGIRI, Rita, P.
Sheridan Ross P.C.
1560 Broadway, Suite 1200
Denver, CO 80202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 26 January 2009 (26.01.2009)	
Applicant's or agent's file reference 6033-1-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/088187	International filing date (day/month/year) 23 December 2008 (23.12.2008)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 27 December 2007 (27.12.2007)
Applicant GEVO, INC. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
27 December 2007 (27.12.2007)	61/017,141	US	11 January 2009 (11.01.2009)
16 January 2008 (16.01.2008)	61/021,567	US	11 January 2009 (11.01.2009)
16 January 2008 (16.01.2008)	61/021,495	US	11 January 2009 (11.01.2009)
16 January 2008 (16.01.2008)	61/021,558	US	11 January 2009 (11.01.2009)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Nora Lindner e-mail PT11.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 11
--	--

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S) <i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> EVANKO, William A. 301 Allen Street Golden, Colorado 80401 UNITED STATES OF AMERICA	
This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
Applicant's registration No. with the Office N/A	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> EYAL, Aharon M. 16, Levy - Jerusalem ISRAEL	
This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
Applicant's registration No. with the Office N/A	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: IL	State <i>(that is, country)</i> of residence: IL
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> GLASSNER, David A. 1120 W. Rowland Avenue Littleton, Colorado 80127 UNITED STATES OF AMERICA	
This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
Applicant's registration No. with the Office N/A	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> MIAO, Fudu 219 Bayberry Drive Chester Springs, Pennsylvania 19425 UNITED STATES OF AMERICA	
This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
Applicant's registration No. with the Office N/A	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/088187

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SANZGIRI, Rita, P.
Sheridan Ross P.C.
1560 Broadway, Suite 1200
Denver, CO 80202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 02 March 2009 (02.03.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 6033-1-PCT	
International application No. PCT/US2008/088187	International filing date (day/month/year) 23 December 2008 (23.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address FUDU, Miao 219 Bayberry Drive Chester Springs, PA 19425 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address MIAO, Fudu 219 Bayberry Drive Chester Springs, PA 19425 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Zoltanski Andrzej
Facsimile No. +41 22 338 70 80	e-mail pt11.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 11

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SANZGIRI, Rita, P.
Sheridan Ross P.C.
1560 Broadway, Suite 1200
Denver, CO 80202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 02 March 2009 (02.03.2009)	
Applicant's or agent's file reference 6033-1-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/088187	International filing date (day/month/year) 23 December 2008 (23.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ARISTIDOU, Aristos, A. 10198 Alexa Lane Highlands Ranch, CO 80130 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☒ the nationality ☐ the residence

Name and Address ARISTIDOU, Aristos, A. 10198 Alexa Lane Highlands Ranch, CO 80130 United States of America	State of Nationality CY	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Zoltanski Andrzej e-mail pt11.pct@wipo.int Telephone No +41 22 338 74 11
---	--

Facsimile No. +41 22 338 70 80

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SANZGIRI, Rita, P.
Sheridan Ross P.C.
1560 Broadway, Suite 1200
Denver, CO 80202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 02 March 2009 (02.03.2009)	
Applicant's or agent's file reference 6033-1-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/088187	International filing date (day/month/year) 23 December 2008 (23.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:			
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative
Name and Address EYAL, Arahon, M. 16, Levy Jerusalem Israel		State of Nationality IL	State of Residence IL
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
☐ the person	☒ the name	☐ the address	☐ the nationality ☐ the residence
Name and Address EYAL, Aharon, M. 16, Levy Jerusalem Israel		State of Nationality IL	State of Residence IL
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:			
4. A copy of this notification has been sent to:			
☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned		
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned		
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Zoltanski Andrzej e-mail pt11.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 11
Facsimile No. +41 22 338 70 80	

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 July 2009 (09.07.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/086391 A2

- (51) International Patent Classification:
C07C 29/76 (2006.01) C07C 33/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2008/088187
- (22) International Filing Date:
23 December 2008 (23.12.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/017,141 27 December 2007 (27.12.2007) US
61/021,567 16 January 2008 (16.01.2008) US
61/021,495 16 January 2008 (16.01.2008) US
61/021,558 16 January 2008 (16.01.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GEVO, INC. [US/US]; 345 Inverness Drive South, Building C, Suite 310, Englewood, CO 80112 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): EVANKO, William, A. [US/US]; 301 Allen Street, Golden, CO 80401 (US). EYAL, Aharon, M. [IL/IL]; 16, Levy, Jerusalem (IL). GLASSNER, David, A. [US/US]; 1120 W. Rowland Avenue, Littleton, CO 80127 (US). MIAO, Fudu [US/US]; 219 Bayberry Drive, Chester Springs, PA 19425

(US). ARISTIDOU, Aristos, A. [CY/US]; 10198 Alexa Lane, Highlands Ranch, CO 80130 (US). EVANS, Kent [US/US]; 5204 S. Everett Court, Littleton, CO 80123 (US). GRUBER, Patrick, R. [US/US]; 8800 Sage Valley Road, Longmont, CO 80503-8885 (US). HAWKINS, Andrew, C. [US/US]; 17377 Cornerstone Drive, Parker, CO 80134 (US).

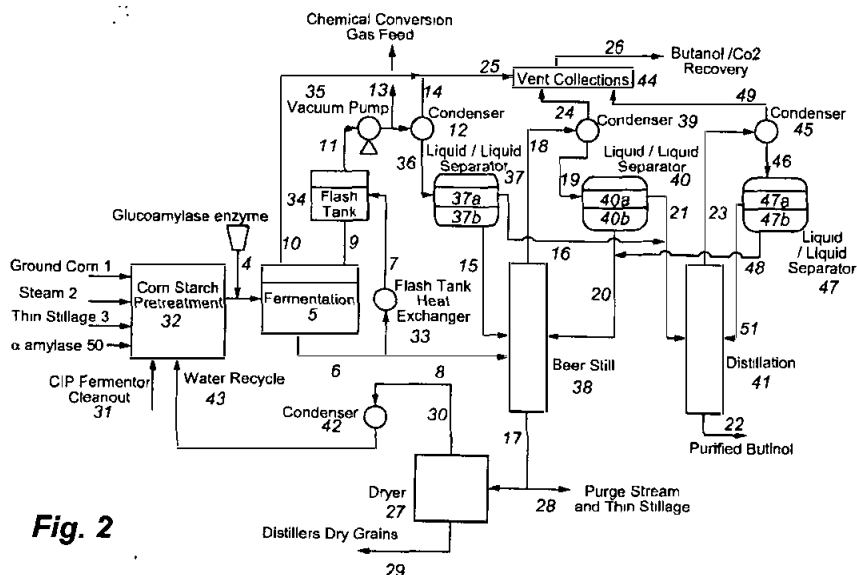
(74) Agent: SANZGIRI, Rita, P.; Sheridan Ross P.C., 1560 Broadway, Suite 1200, Denver, CO 80202 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

(54) Title: RECOVERY OF HIGHER ALCOHOLS FROM DILUTE AQUEOUS SOLUTIONS



(57) Abstract: This invention is directed to methods for recovery of C3-C6 alcohols from dilute aqueous solutions, such as fermentation broths. Such methods provide improved volumetric productivity for the fermentation and allows recovery of the alcohol. Such methods also allow for reduced energy use in the production and drying of spent fermentation broth due to increased effective concentration of the alcohol product by the simultaneous fermentation and recovery process which increases the quantity of alcohol produced and recovered per quantity of fermentation broth dried. Thus, the invention allows for production and recovery of C3-C6 alcohols at low capital and reduced operating costs.



European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
9 July 2009 (09.07.2009)



(10) International Publication Number
WO 2009/086391 A3

(51) International Patent Classification:

B01D 3/10 (2006.01) **B01D 3/38** (2006.01)
B01D 3/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/088187

(22) International Filing Date:

23 December 2008 (23.12.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/017,141	27 December 2007 (27.12.2007)	US
61/021,567	16 January 2008 (16.01.2008)	US
61/021,495	16 January 2008 (16.01.2008)	US
61/021,558	16 January 2008 (16.01.2008)	US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GEVO, INC.** [US/US]; 345 Inverness Drive South, Building C, Suite 310, Englewood, CO 80112 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **EVANKO, William, A.** [US/US]; 301 Allen Street, Golden, CO 80401 (US). **EYAL, Aharon, M.** [IL/IL]; 16, Levy, Jerusalem (IL). **GLASSNER, David, A.** [US/US]; 1120 W. Rowland Avenue, Littleton, CO 80127 (US). **MIAO, Fudu** [US/US]; 219 Bayberry Drive, Chester Springs, PA 19425 (US). **ARISTIDOU, Aristos, A.** [CY/US]; 10198 Alexa Lane, Highlands Ranch, CO 80130 (US). **EVANS, Kent** [US/US]; 5204 S. Everett Court, Littleton, CO 80123 (US). **GRUBER, Patrick, R.** [US/US]; 8800 Sage Valley Road, Longmont, CO 80503-8885 (US).

HAWKINS, Andrew, C. [US/US]; 17377 Cornerstone Drive, Parker, CO 80134 (US).

(74) Agent: **SANZGIRI, Rita, P.**; Sheridan Ross P.C., 1560 Broadway, Suite 1200, Denver, CO 80202 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(88) Date of publication of the international search report:
7 January 2010

(54) Title: RECOVERY OF HIGHER ALCOHOLS FROM DILUTE AQUEOUS SOLUTIONS

(57) Abstract: This invention is directed to methods for recovery of C3-C6 alcohols from dilute aqueous solutions, such as fermentation broths. Such methods provide improved volumetric productivity for the fermentation and allows recovery of the alcohol. Such methods also allow for reduced energy use in the production and drying of spent fermentation broth due to increased effective concentration of the alcohol product by the simultaneous fermentation and recovery process which increases the quantity of alcohol produced and recovered per quantity of fermentation broth dried. Thus, the invention allows for production and recovery of C3-C6 alcohols at low capital and reduced operating costs.

WO 2009/086391 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/88187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - B01D 3/10; B01D 3/00; B01D 3/38 (2009.01)

USPC - 203/81; 203/84; 203/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC - 203/81; 203/84; 203/85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC- 203/78, 203/74, 203/79, 203/80, 203/98, 203/99, 435/162, 435/161

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST, Google Patent, Google Scholar: alcohol, fermentation, broth, water, hydrophilic, solute, distill, vapor, reverse, osmosis, dialysis, adsorb, extraction, propanol, butanol, pentanol, hexanol, pressure, azeotrope, miscible, temperature, adiabatic, isothermal, olefin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/0031954 A1 (Mairal, et al.) 8 Feb 2007 (08.02.2007) Claim 10, para [0011], [0035], [0039], [0042]-[0045], [0049-0055], [0092], [0100], [0106], [0116]-[0122], [0126], [0133]-[0135], [0155]-[0159], [0177]-[0178], [0185], [0194]	1-67, 133-152, 157-159
Y	US 5,084,142 A (Berg, et al.) 28 Jan 1992 (28.01.1992) col 1, ln 15-20, col 2, ln 10-12, 52-55, 64-66; col 4, ln 68, col 6, ln 22-23	1-67, 133-152, 157-159
Y	US 4,538,010 A (Diana) 27 Aug 1985 (27.08.1985) col 9, ln 29-37; col 13, ln 10-13	8, 14-18, 50-54, 143-144, 149
Y	US 4,399,000 A (Tedder) 16 Aug 1983 (16.08.1983) col 4, ln 29-31	157-159
A	Vane. Review: A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. J Chem Technol Biotechnol 2005, 80:6037629	1-67, 133-152, 157-159

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 Apr 2009 (13.04.2009)

Date of mailing of the international search report

20 MAY 2009

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/88187

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1-67, 133-152, 157-159, drawn to a method comprising:

- a. increasing the activity of the C3-C6 alcohol in a portion of the fermentation broth to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the portion;
- b. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich liquid phase from the portion of the fermentation broth; and
- c. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase.

Group II, claims 68-73, 84-132, drawn to a method comprising:

- a. culturing a microorganism in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol;
- b. increasing the activity of the C3-C6 alcohol in a portion of the fermentation medium to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the fermentation medium;
- c. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich phase from the portion of the fermentation medium;
- d. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase.

----- see supplemental sheet -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant; this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
Claims 1-67, 133-152, and 157-159

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 08/88187

***** SUPPLEMENTAL BOX *****

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

Group III, claims 74-77, 153-156, drawn to a method comprising:

- a. hydrolyzing a feedstock;
- b. fermenting at least a portion of the fermentable hydrolysis products in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol;
- c. increasing the activity of the C3-C6 alcohol from a portion of the fermentation medium to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the fermentation medium;
- d. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich phase from the portion of the fermentation medium;
- e. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase; and
- f. separating the at least one non-fermented compound from the fermentation medium, the water-rich phase or both.

Group IV, claims 78-83, drawn to a method comprising:

- a. distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol from the fermentation broth;
- b. reacting the C3-C6 alcohol in the vapor phase to form the product.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-III do not include the inventive concept of reacting the C3-C6 alcohol in the vapor phase to form the product, as required by Group IV.

Groups I and IV do not include the inventive concept of culturing a microorganism in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol, as required by Groups II and III.

Groups I, II, and IV do not include the inventive concept of hydrolyzing a feedstock and fermenting at least a portion of the fermentable hydrolysis products in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol, as required by Group III.

As C3-C6 alcohols were well-known in the art at the time of the invention, they cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify Groups I-IV.

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

original to KPS
COPY SENT TO IDS DEPT
Date: 5/3/09 (Lysco)

PATENT COOPERATION TREATY

WJC/SAC

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
RITA P. SANZGIRI
SHERIDAN ROSS P.C.
1560 BROADWAY, SUITE 1200
DENVER, CO 80202

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

20 MAY 2009

Applicant's or agent's file reference
6033-1-PCT

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US 08/88187

International filing date
(day/month/year) 23 December 2008 (23.12.2008)

Applicant GEVO, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 8270

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

198

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 6033-1-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US 08/88187	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23 December 2008 (23.12.2008)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 27 December 2007 (27.12.2007)
Applicant GEVO, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. 1.

2. ☐ Certain claims were found **unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/88187

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1-67, 133-152, 157-159, drawn to a method comprising:

- a. increasing the activity of the C3-C6 alcohol in a portion of the fermentation broth to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the portion;
- b. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich liquid phase from the portion of the fermentation broth; and
- c. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase.

Group II, claims 68-73, 84-132, drawn to a method comprising:

- a. culturing a microorganism in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol;
- b. increasing the activity of the C3-C6 alcohol in a portion of the fermentation medium to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the fermentation medium;
- c. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich phase from the portion of the fermentation medium;
- d. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase.

----- see supplemental sheet -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-67, 133-152, and 157-159

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/88187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - B01D 3/10; B01D 3/00; B01D 3/38 (2009.01)
USPC - 203/81; 203/84; 203/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 203/81; 203/84; 203/85Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 203/78, 203/74, 203/79, 203/80, 203/98, 203/99, 435/162, 435/161Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST, Google Patent, Google Scholar: alcohol, fermentation, broth, water, hydrophilic, solute, distill, vapor, reverse, osmosis, dialysis, adsorb, extraction, propanol, butanol, pentanol, hexanol, pressure, azeotrope, miscible, temperature, adiabatic, isothermal, olefin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/0031954 A1 (Mairal, et al.) 8 Feb 2007 (08.02.2007) Claim 10, para [0011], [0035], [0039], [0042]-[0045], [0049-0055], [0092], [0100], [0106], [0116]-[0122], [0126], [0133]-[0135], [0155]-[0159], [0177]-[0178], [0185], [0194]	1-67, 133-152, 157-159
Y	US 5,084,142 A (Berg, et al.) 28 Jan 1992 (28.01.1992) col 1, ln 15-20, col 2, ln 10-12, 52-55, 64-66; col 4, ln 68, col 6, ln 22-23	1-67, 133-152, 157-159
Y	US 4,538,010 A (Diana) 27 Aug 1985 (27.08.1985) col 9, ln 29-37; col 13, ln 10-13	8, 14-18, 50-54, 143-144, 149
Y	US 4,399,000 A (Tedder) 16 Aug 1983 (16.08.1983) col 4, ln 29-31	157-159
A	Vane. Review: A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. J Chem Technol Biotechnol 2005, 80:6037629	1-67, 133-152, 157-159

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 Apr 2009 (13.04.2009)

Date of mailing of the international search report

20 MAY 2009

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 08/88187

***** SUPPLEMENTAL BOX *****

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

Group III, claims 74-77, 153-156, drawn to a method comprising:

- a. hydrolyzing a feedstock;
- b. fermenting at least a portion of the fermentable hydrolysis products in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol;
- c. increasing the activity of the C3-C6 alcohol from a portion of the fermentation medium to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the fermentation medium;
- d. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich phase from the portion of the fermentation medium;
- e. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase; and
- f. separating the at least one non-fermented compound from the fermentation medium, the water-rich phase or both.

Group IV, claims 78-83, drawn to a method comprising:

- a. distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol from the fermentation broth;
- b. reacting the C3-C6 alcohol in the vapor phase to form the product.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-III do not include the inventive concept of reacting the C3-C6 alcohol in the vapor phase to form the product, as required by Group IV.

Groups I and IV do not includes the inventive concept of culturing a microorganism in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol, as required by Groups II and III.

Groups I, II, and IV do not includes the inventive concept of hydrolyzing a feedstock and fermenting at least a portion of the fermentable hydrolysis products in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol, as required by Group III.

As C3-C6 alcohols were well-known in the art at the time of the invention,, they cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify Groups I-IV.

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

PATENT COOPERATION TREATY

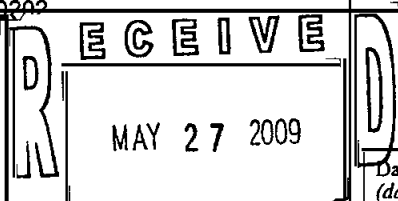
From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
RITA P. SANZGIRI
SHERIDAN ROSS P.C.
1560 BROADWAY, SUITE 1200
DENVER, CO 80202

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)



Date of mailing
(day/month/year)

20 MAY 2009

Applicant's or agent's file reference
6033-1-PCT

SHERIDAN ROSS P.C.
DOCKETING DEPT.

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US 08/88187

International filing date (day/month/year)
23 December 2008 (23.12.2008)

Priority date (day/month/year)
27 December 2007 (27.12.2007)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - B01D 3/10; B01D 3/00; B01D 3/38 (2009.01)
USPC - 203/81; 203/84; 203/85

Applicant GEVO, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Date of completion of this opinion 20 Apr 2009 (20.04.2009)	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	--	--

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/88187

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/88187

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
- ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
- ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

☐ complied with

☒ not complied with for the following reasons:

Group I, claims 1-67, 133-152, 157-159, drawn to a method comprising:

- a. increasing the activity of the C3-C6 alcohol in a portion of the fermentation broth to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the portion;
- b. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich liquid phase from the portion of the fermentation broth; and
- c. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase.

Group II, claims 68-73, 84-132, drawn to a method comprising:

- a. culturing a microorganism in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol;
- b. increasing the activity of the C3-C6 alcohol in a portion of the fermentation medium to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the fermentation medium;
- c. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich phase from the portion of the fermentation medium;
- d. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase.

Group III, claims 74-77, 153-156, drawn to a method comprising:

- a. hydrolyzing a feedstock;
- b. fermenting at least a portion of the fermentable hydrolysis products in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol;
- c. increasing the activity of the C3-C6 alcohol from a portion of the fermentation medium to at least that of saturation of the C3-C6 alcohol in the fermentation medium;
- d. forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich phase from the portion of the fermentation medium;
- e. separating the C3-C6 alcohol-rich phase from the water-rich phase; and
- f. separating the at least one non-fermented compound from the fermentation medium, the water-rich phase or both.

Group IV, claims 78-83, drawn to a method comprising:

- a. distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol from the fermentation broth;
- b. reacting the C3-C6 alcohol in the vapor phase to form the product.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-III do not include the inventive concept of reacting the C3-C6 alcohol in the vapor phase to form the product, as required by Group IV.

Groups I and IV do not include the inventive concept of culturing a microorganism in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol, as required by Groups II and III.

Groups I, II, and IV do not include the inventive concept of hydrolyzing a feedstock and fermenting at least a portion of the fermentable hydrolysis products in a fermentation medium to produce the C3-C6 alcohol, as required by Group III.

As C3-C6 alcohols were well-known in the art at the time of the invention, they cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify Groups I-IV.

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

☐ all parts

☒ the parts relating to claims Nos. 1-67, 133-152, and 157-159

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/88187

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-67, 133-152, 157-159	YES
	Claims	none	NO
Inventive step (IS)	Claims	none	YES
	Claims	1-67, 133-152, 157-159	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-67, 133-152, 157-159	YES
	Claims	none	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-7, 9-13, 19-49, 55-67, 133-142, 145-148 and 150-152 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2007/0031954 A1 to Mairal, et al. (hereinafter "Mairal") in view of US 5,084,142 A to Berg, et al. (hereinafter "Berg").

As per Claim 1, Mairal discloses a method to recover a mixture of C3-C6 alcohol (Claim 10) from a fermentation broth comprising microorganisms and the alcohol (Abstract, "A process for producing and recovering light alcohols, particularly ethanol... using a combination of steps including fermentation, first membrane separation, dephlegmation and dehydration by second membrane separation"), comprising:

a. increasing the activity of the alcohol in a portion of the fermentation broth to at least that of saturation of the alcohol in the portion (para [0133], "Mass transfer between the condensate liquid and the vapor enriches the down-flowing liquid in water and the up-flowing vapor in ethanol");

b. forming a alcohol-rich liquid phase and a water-rich liquid phase from the portion of the fermentation broth (para [0049]); and

c. separating the alcohol-rich phase from the water-rich phase (para [0045]).

Mairal does not disclose the further claim limitation taught by Berg, namely: that said recovered alcohol is an individual C3-C6 alcohol (col 2, in 52-55, t-butyl alcohol). It would have been obvious to combine the alcohol feed stream and distillation process of Berg with the fermentation broth of Mairal in order to recover higher molecular weight alcohols more efficiently and at a lower cost.

As per Claim 2, Mairal discloses that the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the fermentation broth is less than about 9/91 (w/w) (para [0106], "The portion of the broth that is passed as feed to the first membrane separation step comprises water and ethanol as major components. The ethanol content may be any value, but typically ranges from a few percent, such as 2%, 4% or 5%, to a relatively high concentration, such as 10%, 15%, 20% or more, depending on the type of fermentation and number of fermentation stages. Generally, the concentration is between about 5% and 20%, and more preferably between about 10% and 15%. Commonly, the concentration is no higher than about 12% or 14%, as higher concentrations of ethanol in the broth suppress ferment.")

As per Claim 3, Mairal discloses that the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the fermentation broth is less than about 6/94 (w/w) (para [0106]).

As per Claim 4, Mairal discloses that the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the fermentation broth is less than about 3/97 (w/w) (para [0106]).

As per Claim 5, Mairal discloses that the step of increasing the activity is reverse osmosis (para [0158]).

As per Claim 6, Mairal discloses that the C3-C6 alcohol is propanol (Claim 10) and the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the C3-C6 alcohol-rich phase is greater than about 0.2 (w/w) (para [0122]).

As per Claim 7, Berg discloses that the C3-C6 alcohol is butanol (col 2, in 52-55, t-butyl alcohol) and the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the C3-C6 alcohol-rich phase is greater than about 1 (w/w) (col 4, in 68).

As per Claim 9, Berg discloses that the C3-C6 alcohol is butanol (col 2, in 52-55, t-butyl alcohol).

As per Claim 10, Mairal further discloses that the C3-C6 alcohol is propanol (Claim 10).

As per Claim 11, Mairal further discloses that the propanol is 2-propanol (Claim 10 - iso-propanol).

As per Claims 12 and 13, Berg further discloses that the C3-C6 alcohol is tert-butanol (col 2, in 52-55, t-butyl alcohol).

As per Claim 19, Mairal further discloses cooling the C3-C6 alcohol-rich phase to increase the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the C3-C6 alcohol rich phase (para [0055]).

As per Claim 20, Mairal discloses recovering C3-C6 alcohol from the C3-C6 alcohol-rich phase by dialysis (para [0039], through a membrane separation).

As per Claim 21, Mairal discloses that the second phase comprises at least about 90% by weight C3-C6 alcohol (para [0050]).

As per Claim 22, Mairal discloses that the second phase comprises at least about 95% by weight C3-C6 alcohol (para [0050]).

As per Claim 23, Mairal discloses that the second phase comprises at least about 99% by weight C3-C6 alcohol (para [0050]).

see supplemental sheet

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/88187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box No. V.2. Citations and explanations:

As per Claim 24, Berg discloses that the step of recovering comprises distilling the C3-C6 alcohol-rich phase (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses that the first phase comprises a vapor phase comprising C3-C6 alcohol and water (para [0049] - water-rich condensate) and wherein the second phase comprises a high boiling product comprising C3-C6 alcohol (para [0049], alcohol-rich vapor).

As per Claim 25, Mairal discloses combining the fermentation broth (403) (para [0177]) with the water-rich phase from step (c) (408) (para [0178]), prior to the step of increasing the activity of the C3-C6 alcohol (para [0133], "Mass transfer between the condensate liquid and the vapor enriches the down-flowing liquid in water and the up-flowing vapor in ethanol").

As per Claim 26, Mairal discloses a process comprising after the step of increasing the activity (para [0133], "Mass transfer between the condensate liquid and the vapor enriches the down-flowing liquid in water and the up-flowing vapor in ethanol"), conducting the remaining portion of the dilute aqueous solution to a fermentation vessel (para [0159]).

As per Claim 27, Mairal discloses that the remaining portion comprises an impurity (para [0159] - solids) and the method further comprises removing at least a portion of the impurity from at least a portion of the remaining portion before the step of conducting (para [0159]).

As per Claim 28, Mairal discloses that the fermentation broth comprises an impurity (para [0159] - solids) and the ratio of the impurity to the C3-C6 alcohol in the C3-C6 alcohol-rich liquid phase (211) is greater than the ratio in the water-rich phase (202) (para [0159]).

As per Claim 29, Berg discloses that the step of increasing the activity comprises distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses condensing the vapor phase (para [0131]). In addition, Mairal discloses that the method further comprises treating the portion of the fermentation broth for water removal before the step of distilling or simultaneously with it by selective rejection of water (para [0039]).

As per Claim 30, Berg discloses that the step of increasing the activity comprises distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses condensing the vapor phase (para [0131]) and treating a portion of the fermentation broth for water removal by reverse osmosis (para [0158]).

As per Claim 31, Berg discloses that the step of increasing the activity comprises distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses condensing the vapor phase (para [0131]) and that the method further comprises treating the C3-C6 alcohol-rich phase before the step of distilling or simultaneously with it by selective rejection of water (para [0039]).

As per Claim 32, Berg discloses that the step of increasing the activity comprises distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses condensing the vapor phase (para [0131]) and treating the C3-C6 alcohol-rich phase for water removal by reverse osmosis (para [0158]).

As per Claim 33, Mairal discloses that the ratio of the alcohol to water in the alcohol-rich phase (para [0050], as high as 99%) is greater than the ratio of the alcohol to water in the fermentation broth by at least about 5 fold (para [0106], as low as 2%). In addition, Berg discloses that said alcohol is a C3-C6 alcohol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol).

As per Claim 34, Berg discloses that the step of increasing the activity comprises distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses condensing the vapor phase (para [0131]).

As per Claim 35, Mairal discloses that the step of distilling is conducted at below atmospheric pressure (0.1 atm) (para [0194]). In addition, Berg discloses that the distillation takes place at a temperature of between about 20 degrees C and about 95 degrees C (col 6, In 22-23).

As per Claim 36, Berg discloses that the step of distilling is conducted in a distillation vessel (col 1, In 15-20).

As per Claim 37, Berg discloses that the portion of the fermentation broth is at the temperature of between about 20 degrees C and about 95 degrees C prior to introduction into the distillation vessel (col 6, In 22-23).

As per Claim 38, Mairal discloses that the portion of the fermentation broth is subjected to the below atmospheric pressure (0.1 atm) in the distillation vessel (para [0194]).

As per Claim 39, Berg discloses a distilling step (col 2, In 64-66). In addition, Mairal further discloses conducting the remaining portion of the fermentation broth to a fermentation vessel (para [0159]).

As per Claim 40, Mairal further discloses that the fermentation vessel is at atmospheric pressure (para [0121]).

As per Claim 41, Mairal further discloses that the fermentation vessel is at below atmospheric pressure (para [0194] - 0.1 atm).

As per Claim 42, Mairal further discloses that the fermentation vessel is at above atmospheric pressure (para [0120]).

As per Claim 43, Berg discloses a distilling step (col 2, In 64-66). In addition, Mairal further discloses that this step is conducted at a pressure of from about .025 bar to about 10 bar (para [0120]).

As per Claim 44, Mairal further discloses that the step of distilling (para [0011]) is conducted in a fermentation vessel (para [0159]).

As per Claim 45, Berg discloses that the C3-C6 alcohol is butanol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol).

As per Claim 46, Mairal further discloses that the C3-C6 alcohol is propanol (Claim 10).

As per Claim 47, Mairal further discloses that the propanol is 2-propanol (Claim 10 - iso-propanol).

As per Claim 48, Berg further discloses that the C3-C6 alcohol is butanol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol).

As per Claim 49, Berg further discloses that the butanol is tert-butanol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol).

---see Supplemental Box #2 ---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 08/88187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box No. V.2. Citations and explanations and the preceding Supplemental Box #1:

As per Claim 55, Mairal further discloses cooling the C3-C6 alcohol-rich phase to increase the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the C3-C6 alcohol rich phase (para [0055]).

As per Claim 56, Mairal discloses recovering C3-C6 alcohol from the C3-C6 alcohol-rich phase by dialysis (para [0039], through a membrane separation).

As per Claim 57, Mairal further discloses that the second phase comprises at least about 90% by weight C3-C6 alcohol (para [0050]).

As per Claim 58, Mairal further discloses that the second phase comprises at least about 95% by weight C3-C6 alcohol (para [0050]).

As per Claim 59, Mairal further discloses that the second phase comprises at least about 99% by weight C3-C6 alcohol (para [0050]).

As per Claim 60, Berg discloses that the step of recovering comprises distilling the C3-C6 alcohol-rich phase (col 2, In 64-66). In addition, Mairal discloses that the first phase comprises a vapor phase comprising alcohol and water (para [0049] - water-rich condensate) and wherein the second phase comprises a high boiling product comprising C3-C6 alcohol (para [0049], alcohol-rich vapor).

As per Claim 61, Berg discloses that the vapor phase comprises an azeotrope of water and the C3-C6 alcohol (col 2, In 10-12).

As per Claim 62, Mairal discloses that the ratio of alcohol to water in the alcohol-rich phase (para [0050] - at least 99% after membrane separation) is greater than the ratio in the azeotrope (para [0049], 90% alcohol).

As per Claim 63, Mairal further discloses processing the C3-C6 alcohol-rich phase (para [0050], by dehydration).

As per Claim 64, Mairal discloses that the step of processing includes contacting the C3-C6 alcohol-rich phase with a C3-C6 alcohol-rich phase with a C3-C6 alcohol-selective adsorbent (para [0185] - based on ethanol-water selectivity values listed in Table 1).

As per Claim 65, Mairal further discloses that the step of processing comprises combining the C3-C6 alcohol-rich phase with a hydrocarbon liquid (103) that is immiscible in water (para [0155]) and the combination forms a single uniform phase (105) (para [0156]).

As per Claim 66, Mairal further discloses that the step of processing comprises combining the C3-C6 alcohol-rich phase with a hydrocarbon liquid (103) that is immiscible in water (para [0155]) and the combination forms a light phase and a heavy phase (para [0157]) wherein the ratio of C3-C6 alcohol to water in the light phase (107) is greater than the ratio of C3-C6 alcohol to water in the heavy phase (108) (para [0157]).

As per Claim 67, Mairal discloses a method to recover an alcohol from a fermentation broth comprising microorganisms and the alcohol, comprising:

a. decreasing the activity of water in a portion of the fermentation broth to at least that of saturation of the alcohol in the portion (para [0043], by adjusting the temperature across the membrane modules);

b. forming a water-rich liquid phase and a alcohol-rich phase from the portion of the fermentation broth (para [0049]); and

c. separating the water-rich phase and the alcohol-rich phase (para [0045]).

Mairal does not disclose the further claim limitation taught by Berg, namely: that said recovered alcohol is a C3-C6 alcohol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol). It would have been obvious to combine the alcohol feed stream and distillation process of Berg with the fermentation broth of Mairal in order to recover more stable alcohols more efficiently and at a lower cost.

As per Claim 133, Berg discloses that the step of increasing the activity comprises distilling a vapor phase comprising water and C3-C6 alcohol (col 2, In 64-66).

Berg does not disclose the further claim limitation taught by Mairal, namely: condensing the vapor phase (para [0131]). In addition, Mairal discloses that the vapor phase comprises between about 1% by weight and about 45% by weight of the first amount of C3-C6 alcohol from the portion of the dilute aqueous solution (para [0044]). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feed of Mairal with the distillation process of Berg in order to isolate an alcohol solution of a desired purity.

As per Claim 134, Mairal further discloses that the vapor phase comprises between about 2% by weight and about 40% by weight of the C3-C6 alcohol from the dilute aqueous solution (para [0106]).

As per Claim 135, Mairal further discloses that the vapor phase comprises between about 3% by weight and about 35% by weight of the C3-C6 alcohol from the dilute aqueous solution (para [0106]).

As per Claim 136, Mairal further discloses that the vapor phase comprises between about 4% by weight and about 30% by weight of the C3-C6 alcohol from the dilute aqueous solution (para [0106]).

As per Claim 137, Mairal further discloses that the vapor phase comprises between about 5% by weight and about 25% by weight of the C3-C6 alcohol from the dilute 30 aqueous solution (para [0106]).

As per Claim 138, Mairal further discloses forming a C3-C6 alcohol-rich liquid phase and a water-rich liquid phase from the condensed vapor phase (para [0126]).

As per Claim 139, Mairal further discloses separating the C3-C6 alcohol-rich phase and the water-rich phase (para [0126] - by a membrane).

As per Claim 140, Berg discloses that the step of distilling is conducted in a distillation column (col 1, In 15-20).

--- See Supplemental Box #3 ---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 08/88187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box No. V.2. Citations and explanations and the preceding Supplemental Box #2:

As per Claim 141, Mairai further discloses that the C3-C6 alcohol is propanol (Claim 10).

As per Claim 142, Berg further discloses that the C3-C6 alcohol is butanol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol).

As per Claim 145, Mairai further discloses that the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the fermentation broth is less than about 9/91 (w/w) (para [0106]).

As per Claim 146, Mairai further discloses that the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the fermentation broth is less than about 6/94 (w/w) (para [0106]).

As per Claim 147, Mairai further discloses that the ratio of the C3-C6 alcohol to water in the fermentation broth is less than about 3/97 (w/w) (para [0106]).

As per Claim 148, Mairai discloses that the step of distilling is adiabatic (para [0047] . all of the heat energy required to effect the separation is provided by the vapor itself).

As per Claim 150, Mairai further discloses that the enrichment of alcohol from the dilute aqueous solution (para [0106], as low as 5%) to the condensed vapor (para [0135], 90% alcohol by weight) is at least about 5 fold.

As per Claim 151, Mairai further discloses that the enrichment of alcohol from the dilute aqueous solution (para [0106], as low as 5%) to the condensed vapor (para [0135], 90% alcohol by weight) is at least about 10 fold.

As per Claim 152, Mairai discloses that the enrichment of alcohol from the dilute aqueous solution (para [0106], as low as 5%) to the condensed vapor (para [0135], 90% alcohol by weight) is at least about 15 fold.

Claims 8, 14-18, 50-54, 143-144 and 149 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Mairai in view of Berg, further in view of US 4,538,010 A (Diana).

As per Claim 8, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is pentanol (col 9, In 34-37 - pentanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 14, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the butanol is iso-butanol (col 9, In 35). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 15, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is pentanol (col 9, In 34-37 - pentanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 16, in light of Berg's disclosure of pentanols, (col 9, In 34-37) and saturated mono-alcohols (col 9, In 29-34), it would have been obvious to a person of skill in the art that the pentanol is 1-pentanol, 2-pentanol or 3-pentanol.

As per Claim 17, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is hexanol (col 9, In 36 - hexanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 18, in light of Berg's disclosure of hexanols, (col 9, In 36) and saturated mono-alcohols (col 9, In 29-34), it would have been obvious to a person of skill in the art that the C3-C6 alcohol is 1-hexanol, 2-hexanol or 3-hexanol.

As per Claim 50, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the butanol is iso-butanol (col 9, In 35). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 51, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is pentanol (col 9, In 34-37 - pentanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 52, in light of Berg's disclosure of pentanols, (col 9, In 34-37) and saturated mono-alcohols (col 9, In 29-34), it would have been obvious to a person of skill in the art that the pentanol is 1-pentanol, 2-pentanol or 3-pentanol.

As per Claim 53, Mairai and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is hexanol (col 9, In 36 - hexanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairai in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 54, in light of Berg's disclosure of hexanols, (col 9, In 36) and saturated mono-alcohols (col 9, In 29-34), it would have been obvious to a person of skill in the art that the C3-C6 alcohol is 1-hexanol, 2-hexanol or 3-hexanol.

-----see supplemental Box #4-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 08/88187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box No. V.2. Citations and explanations and the preceding Supplemental Box #3:

As per Claim 143, Mairal and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is pentanol (col 9, In 34-37 - pentanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairal in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 144, Mairal and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Diana, namely: that the C3-C6 alcohol is hexanol (col 9, In 36 - hexanols). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the alcohol feeds of Diana with the distillation process of Berg and the membrane separation of Mairal in order to isolate a more stable alcohol product.

As per Claim 149, Diana discloses that the step of distilling is isothermal (col 13, In 10-13). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the isothermal process of Diana with the distillation column of Berg and the membrane separation of Mairal in order to keep the liquid phase from vaporizing through the distillation process.

Claims 157-159 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Mairal in view of Berg, further in view of US 4,399,000 A (Tedder).

As per Claim 157, Mairal discloses an alcohol solution (para [0100]). Mairal does not disclose the further claim limitations taught by Berg, namely: that the solution comprises a C3-C6 alcohol (col 2, In 52-55, t-butyl alcohol). Mairal and Berg do not disclose the further claim limitation taught by Tedder, namely: contacting the aqueous solution with an acidic, amine-based alcohol-selective extractant (col 4, In 29-31 - ammonium and phosphonium salts of sterically hindered carboxylic acids possessing structural features which facilitate alcohol complexation). It would have been obvious to a person of skill in the art to combine the amine-based extractant of Tedder with the alcohol feed of Mairal and the distillation process of Berg in order to remove a greater quantity of water from the alcohol solution.

As per Claim 158, Tedder discloses that the acidic amine-based extractant is formed by acidifying an organic amine solution (col 4, In 29-31 - ammonium and phosphonium salts of sterically hindered carboxylic acids).

As per Claim 159, Mairal further discloses that two phases form after said contacting (para [0116], before the separation step).

Claims 1-67, 133-152 and 157-159 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.



No. 10-077725-00000-0000

Fecha: 2010-06-28 15:03:46

Dep. 2020 DIR NUEVASCR

Tra. 11 PATENTE IYI

Eve: 378 FASE NACIONAL

Act 411 PRESENTACION

Folios: 210

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA
PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐PATENTE DE INVENCION PCT ☒MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT.

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒Incompleta ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020



Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GEVO, INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 077725
	Solicitud internacional	PCT/US2008/088187
	Fecha inicio fase nacional	27/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	NO 1 0546

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

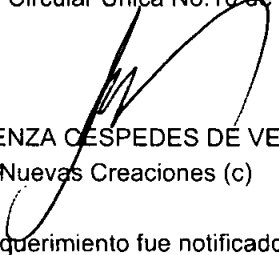
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 077725



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 ABO. 2010
adpa11