

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **Bioengineering Resources, Inc.**

Dirección: 1650 Emmaus Road

Nacionalidad o Domicilio: Fayetteville,
Arkansas 72701, Estados Unidos de
América.

Lugar de Constitución: Arkansas, Estados
Unidos de América

Teléfono:

Fax

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre **JIMENA ESCOBAR URIBE**

Dirección Cra 11A No 94-76 (Of 305)

Teléfono 6 162051/61 Fax 6 161889

E-mail **escobaru@elsitio net co**

IDENTIFICACIÓN

C C

☒

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Número 39 779 452 T P 68,228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER ANEXO**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No

PCT/US01/23149

Fecha

Julio 23, 2001

Publicación Internacional No.

WO 02/08438 A3

Fecha

Enero 31, 2002

6 TÍTULO (54)

**MÉTODOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE UNA
FERMENTACIÓN MICROBIANA**

6 Clasificación Internacional (51)

C 12 P 7/06

7 Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de America

(32)

Fecha

Julio 25, 2000

(31) Numero de Solicitud

60/220,794

9 Comprobante de pago No.

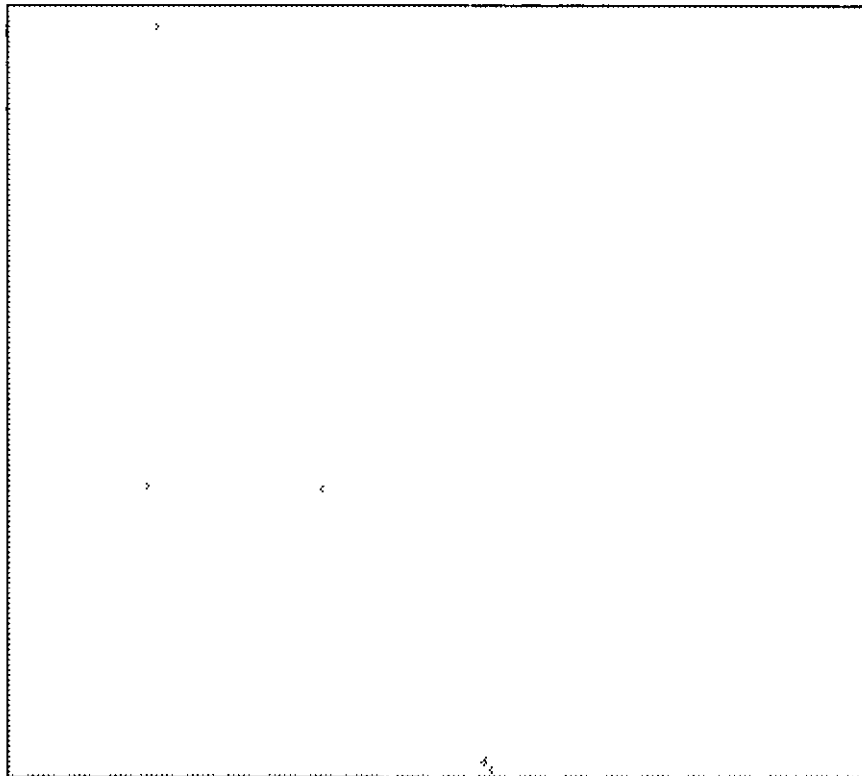
03 - 842

Fecha

Enero 7, 2003

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentacion de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representacion legal cuando el solicitante sea persona juridica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesion del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripcion, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traduccion de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripcion, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traduccion 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 autorizacion de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indigenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biologico
- ☐ Arte final 12 X 12
- ☐ De ser el caso, informacion sobre otras solicitudes de patente o titulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invencion de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

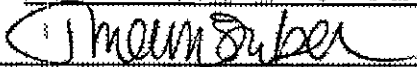
11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA



C.C. 39 779 452 de Usaquen T.P. 68 228

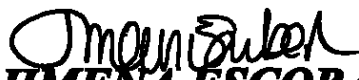
2520/PCT

ANEXOS**INVENTORES**

- 1.) **JAMES L. GADDY**
(Fayetteville, Arkansas 72703, Estados Unidos de América);
- 2.) **DINESH K. ARORA**
(Fayetteville, Arkansas 72703, Estados Unidos de América);
- 3.) **CHING-WHAN KO**
(Fayetteville, Arkansas 72701, Estados Unidos de América);
- 4.) **JOHN RANDALL PHILLIPS**
(Fayetteville, Arkansas 72703, Estados Unidos de América);
- 5.) **RAHUL BASU**
(Fayetteville, Arkansas 72702, Estados Unidos de América);
- 6.) **CARL V. WIKSTROM**
(Fayetteville, Arkansas 72703, Estados Unidos de América);
- 7.) **EDGAR C. CLAUSEN**
(Fayetteville, Arkansas 72704, Estados Unidos de América).

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
BIOENGINEERING RESOURCES, INC,
 sociedad constituida de conformidad con las leyes del
 estado de Arkansas, Estados Unidos de América,
 domiciliada en 1650 Emmaus Road, Fayetteville,
 Arkansas 72701, Estados Unidos de América, el
 otorgamiento de Patente para la invención titulada
**"MÉTODOS PARA INCREMENTAR LA
 PRODUCCIÓN DE ETANOL DE UNA
 FERMENTACIÓN MICROBIANA "**.

Clase: C 12


JIMENA ESCOBAR URIBE
 C.C. 39.779.452 de Usaquen
 T.P . 68.228

2520



4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 900171089

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 83882538 88888888

Folios: 124

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 342
FECHA : ENERO 7 DE 2003

Fecha (AMD): 2003-01-16 16:01:59

Tramite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2828 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PASO	Vr. PASO
ESSECAR UPIDE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	950-00110-6	9022091	07/01/2003	2,424,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.00

SCH: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

PCT

REQUEST

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

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) CEL28PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHODS FOR INCREASING THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM MICROBIAL
FERMENTATION

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.)

Bioengineering Resources, Inc.
1650 Emmaus Road
Fayetteville, Arkansas 72701
US

Telephone No.
501-521-2745Facsimile No.
501-521-2749

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
USThis 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)

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.)

Gaddy, James L.
2207 Tall Oaks Drive
Fayetteville, Arkansas 72703
US

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

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
USThis 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 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.)

Bak, Mary E.
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P.O. Box 457
Spring House, Pennsylvania 19477
US

Telephone No.
215-540-9200Facsimile No.
215-540-5818

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
31,215

☐ 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.

Continuation of 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.)		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
Arora, Dinesh K. 2725 Wakefield Place Fayetteville, Arkansas 72703 US		Applicant's registration No. with the Office
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.)		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
Ko, Ching-Whan 1245 Mission Blvd. Fayetteville, Arkansas 72701 US		Applicant's registration No. with the Office
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.)		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
Phillips, John Randall 2425 Sharon Fayetteville, Arkansas 72703 US		Applicant's registration No. with the Office
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.)		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
Basu, Rahul 572 Dockery Lane Fayetteville, Arkansas 72702 US		Applicant's registration No. with the Office
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.		

Continuation of 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.) Wikstrom, Carl V. 2832 Centerwood Fayetteville, Arkansas 72703 US	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
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.) Clausen, Edgar C. 5137 Wingfoot Fayetteville, Arkansas 72704 US	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
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.)	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
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
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.)	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
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
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. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

- ☒ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | | |
|---|--|--|
| ☒ AE United Arab Emirates | ☒ GH Ghana | ☒ MX Mexico |
| ☒ AG Antigua and Barbuda | ☒ GM Gambia | ☒ MZ Mozambique |
| ☒ AL Albania | ☒ HR Croatia | ☒ NO Norway |
| ☒ AM Armenia | ☒ HU Hungary | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ AT Austria | ☒ ID Indonesia | ☒ PL Poland |
| ☒ AU Australia | ☒ IL Israel | ☒ PT Portugal |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ IN India | ☒ RO Romania |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina | ☒ IS Iceland | ☒ RU Russian Federation |
| ☒ BB Barbados | ☒ JP Japan | |
| ☒ BG Bulgaria | ☒ KE Kenya | ☒ SD Sudan |
| ☒ BR Brazil | ☒ KG Kyrgyzstan | ☒ SE Sweden |
| ☒ BY Belarus | ☒ KP Democratic People's Republic of Korea | ☒ SG Singapore |
| ☒ BZ Belize | ☒ KR Republic of Korea | ☒ SI Slovenia |
| ☒ CA Canada | ☒ KZ Kazakhstan | ☒ SK Slovakia |
| ☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ LC Saint Lucia | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ CN China | ☒ LK Sri Lanka | ☒ TJ Tajikistan |
| ☒ CO Colombia | ☒ LR Liberia | ☒ TM Turkmenistan |
| ☒ CR Costa Rica | ☒ LS Lesotho | ☒ TR Turkey |
| ☒ CU Cuba | ☒ LT Lithuania | ☒ TT Trinidad and Tobago |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ LU Luxembourg | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ DE Germany | ☒ LV Latvia | ☒ UA Ukraine |
| ☒ DK Denmark | ☒ MA Morocco | ☒ UG Uganda |
| ☒ DM Dominica | ☒ MD Republic of Moldova | ☒ US United States of America |
| ☒ DZ Algeria | | |
| ☒ EC Ecuador | ☒ MG Madagascar | ☒ UZ Uzbekistan |
| ☒ EE Estonia | ☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | ☒ VN Viet Nam |
| ☒ ES Spain | ☒ MN Mongolia | ☒ YU Yugoslavia |
| ☒ FI Finland | ☒ MW Malawi | ☒ ZA South Africa |
| ☒ GB United Kingdom | | ☒ ZW Zimbabwe |
| ☒ GD Grenada | | |
| ☒ GE Georgia | | |

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ☐ | ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ | ☐ |

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

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. VII(1) to (4) 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 two persons are to be indicated as applicants and/or inventors 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. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;*
 - (vi) *If, in Box No. VI, there are more than five 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, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.*

*Continuation of Box No. IV

Kita, Stanley B.
 Smith, George A., Jr.
 Kodroff, Cathy A.
 Bak, William
 Palovich, Tracy *

* registered USPTO patent agent only

All above attorneys are members of the firm of
 Howson and Howson.

Address of all is indicated in Box No. IV.

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	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 25 July 2000 (25.07.00)	60/220,784	US		
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

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) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(i)). . . .

Box No. VII

INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

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

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)NumberCountry (or regional Office)

Box No. VIII

DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING**This international application contains:****(a) the following number of sheets in paper form:**

request (including declaration sheets) : 7
 description (excluding sequence listing part) : 82
 claims : 5
 abstract : 1
 drawings : 2

Sub-total number of sheets : 77

sequence listing part of description (actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below) :

Total number of sheets : 77

(b) sequence listing part of description filed in computer readable form(i) ☐ only (under Section 801(a)(i))(ii) ☐ in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (additional copies to be indicated under item 9(i), in right column):

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**

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): :
7. ☐ translation of international application into (language): :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))
 - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :
 - (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (b)(ii) 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 part mentioned in left column :
10. ☒ other (specify): transmittal letter to the USRO : 1

Figure of the drawings which should accompany the abstract:**Language of filing of the international application:** English**Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMISSION 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: Mary E. Bal
 Mary E. Bal
 Attorney for Applicants

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:

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

2. Drawings:

☐ received:☐ not received:**For International Bureau use only**

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08438 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12P 7/06
// C12R 1:145, 1:01, 1:02

(74) Agents: BAK, Mary, E. et al.: Howson and Howson,
Spring House Corporate Center, P.O. Box 457, Spring
House, PA 19477 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/23149

(22) International Filing Date: 23 July 2001 (23.07.2001)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/220,794 25 July 2000 (25.07.2000) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): BIO-
ENGINEERING RESOURCES, INC. (US/US); 1650
Emmaus Road, Fayetteville, AR 72701 (US).

Published:
— with international search report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GADDY, James, L.
(US/US); 2307 Tall Oaks Drive, Fayetteville, AR 72703
(US); ARORA, Dinesh, K. (US/US); 2725 Wakefield
Place, Fayetteville, AR 72703 (US); KO, Ching-Whan
(US/US); 1245 Mission Boulevard, Fayetteville, AR
72701 (US); PHILLIPS, John, Randall (US/US); 2425
Sharon, Fayetteville, AR 72703 (US); BASU, Rahul
(IN/US); 572 Dockery Lane, Fayetteville, AR 72702 (US);
WIKSTROM, Carl, V. (US/US); 2832 Centerwood Road,
Fayetteville, AR 72703 (US); CLAUSEN, Edgar, C.
(US/US); 5137 Wingfoot Road, Fayetteville, AR 72703
(US).

(88) Date of publication of the international search report:
27 June 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/08438 A3

(54) Title: METHODS FOR INCREASING THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM MICROBIAL FERMENTATION

(57) Abstract: A stable continuous method for producing ethanol from the anaerobic bacterial fermentation of a gaseous substrate containing at least one reducing gas involves culturing a fermentation bioreactor anaerobic, acetogenic bacteria in a liquid nutrient medium; supplying the gaseous substrate to the bioreactor; and manipulating the bacteria in the bioreactor by reducing the redox potential, or increasing the NAD(P)H TO NAD(P) ratio, in the fermentation broth after the bacteria achieves a steady state and stable cell concentration in the bioreactor. The free acetic acid concentration in the bioreactor is maintained at less than 5 g/L free acid. This method allows ethanol to be produced in the fermentation broth in the bioreactor at a productivity greater than 10g/L per day. Both ethanol and acetate are produced in a ratio of ethanol to acetate ranging from 1:1 to 20:1.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CEL28PCT	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US 01/ 23149	International filing date (day/month/year) 23/07/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 25/07/2000
Applicant BIOENGINEERING RESOURCES, 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 2 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, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

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 36.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☐ None of the figures.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P7/06 //C12R1:145,C12R1:01,C12R1:02		
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) IPC 7 C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 00 68407 A (GADDY JAMES L ;BIOENGINEERING RESOURCES INC (US)) 16 November 2000 (2000-11-16) claims	1
A	US 5 807 722 A (GADDY JAMES L) 15 September 1998 (1998-09-15) cited in the application	
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* 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 document 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. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 January 2002		Date of mailing of the international search report 23/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/23149

15

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0068407 A	16-11-2000	WO 0068407 A1	16-11-2000
		AU 3789699 A	21-11-2000
US 5807722 A	15-09-1998	BR 9612653 A	28-12-1999
		CA 2259492 A1	08-01-1998
		CN 1228124 A	08-09-1999
		AU 724215 B2	14-09-2000
		AU 6344196 A	21-01-1998
		EP 0909328 A1	21-04-1999
		WO 9800558 A1	08-01-1998
		US 6136577 A	24-10-2000
		US 5593886 A	14-01-1997
		JP 2000513233 T	10-10-2000

IPEA/EP

16

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION Applicant's or agent's file reference CEL28PCT	
International application No. PCT/US01/23149	International filing date (day/month/year) 23 July 2001 (23/07/01)
(Earliest) Priority date (day/month/year) 25 July 2000 (25/07/00)	
Title of invention METHODS FOR INCREASING THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM MICROBIAL FERMENTATION	
Box No. II APPLICANT(S)	
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.)	
Bioengineering Resources, Inc. 1650 Emmaus Road Fayetteville, Arkansas 72701 US	
Telephone No. 501-521-2745	
Facsimile No. 501-521-2749	
Teleprinter No.	
Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
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.)	
Gaddy, James L. 2207 Tall Oaks Drive Fayetteville, Arkansas 72703 US	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
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.)	
Arora, Dinesh K. 2725 Wakefield Place Fayetteville, Arkansas 72703 US	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.	

Sheet No. 2.

International application No.
PCT/US01/23149

17

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

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.)

Ko, Ching-Whan
1245 Mission Blvd.
Fayetteville, Arkansas 72701

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

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.)

Phillips, John Randall
2425 Sharon
Fayetteville, Arkansas 72703
US

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

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.)

Basu, Rahul
572 Dockery Lane
Fayetteville, Arkansas 72702
US

State (that is, country) of nationality:

IN

State (that is, country) of residence:

US

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.)

Wikstrom, Carl V.
2832 Centerwood
Fayetteville, Arkansas 72703
US

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

☒ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.*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.)*

Clausen, Edgar C.
5137 Wingfoot
Fayetteville, Arkansas 72704
US

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
USName 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.)*

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

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.)*

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

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.)*

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.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.)Bak, Mary E.
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P.O. Box 457
Spring House, Pennsylvania 19477
US

Telephone No.

215-540-9200

Facsimile No.

215-540-5818

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

31,215

☐ 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. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION**

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☐ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☐ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). (This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**

The applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary
Examining Authority use only

received	not received
----------	--------------

☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ other (specify): |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | |

Box No. VII 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 demand).

By: Mary E. Pak
Mary E. Pak
Attorney for Applicants

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:
BAK, Mary E.
HOWSON AND HOWSON
Spring House Corporate Center
P.O. Box 457
Spring House, PA 19477
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 04/04/2002

Applicant's or agent's file reference
CEL28PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US 01/ 23149

International filing date (day/month/year)
23/07/2001

Priority date (day/month/year)
25/07/2000

Applicant

BIOENGINEERING RESOURCES, INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

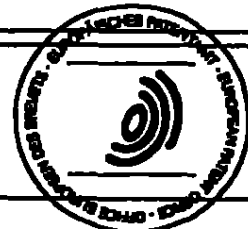
Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Authorized officer

MORENO R A
Tel. (+49-89) 2399 2828



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CEL28PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US 01/ 23149	International filing date (day/month/year) 23/07/2001	Priority date (day/month/year) 25/07/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P7/06		
Applicant BIOENGINEERING RESOURCES, INC. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22/02/2002	Date of completion of this report 28/03/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523636 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer FERNANDEZ Y BRANAS F J Tel. (+49-89) 2399 2828



Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/US 01/ 23149

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in the claims meets the criteria mentioned in Article 33 (1) PCT, i.e. it appears to be novel, to involve an inventive step and to be industrially applicable.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES
PCT
INFORME EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT artículo 36 y regla 70)

Referencia del solicitante o agente CEL28PCT	PARA PROSEGUIR Ver notificación de la transmisión del examen preliminar internacional (formato PCT/IPEA/416)	
No. Solicitud Internacional PCT/US 01/23149	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 23/07/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 25/07/2000
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C12P7/08		
Solicitante BIOENGINEERING RESOURCES, INC. Et al.		

1. Este examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad encargada del Examen Preliminar Internacional y es transmitida al solicitante de acuerdo con el artículo 36.

2. Este INFORME consiste de un total de 2 páginas, incluyendo esta hoja.

___ Este informe también está acompañado por ANEXOS, esto es hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos, los cuales han sido modificados y son la base para este informe y/o hojas que contienen rectificaciones presentadas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas bajo el PCT).

Estos anexos consisten en un total de ___ hojas.

3. Este informe contiene indicaciones que se relacionan con los siguientes puntos:

I.	<u>X</u>	Base del Informe
II.	___	Prioridad
III.	___	El no-establecimiento de opinión en relación con la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial
IV.	___	Falta de unidad de invención
V.	<u>X</u>	Declaración motivada bajo el Art. 35(2) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración
VI.	___	Ciertos documentos citados
VII.	___	Ciertos defectos en la solicitud internacional
VIII.	___	Ciertas observaciones en la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda 22/02/2002	Fecha en que se completó este informe 28/03/2002
Nombre y dirección de la autoridad encargada del examen preliminar internacional: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Oficial autorizado FERNANDEZ Y BRANAS F J Teléfono: +49 89 2399 2828

**INFORME DEL EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL**

Solicitud internacional No. PCT/US 01/23149

I. BASE DEL INFORME

La base de este informe del examen preliminar internacional es la solicitud como fue presentada originalmente.

V. Declaración motivada bajo la Regla 66.2 (a) (II) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha declaración

A la luz de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional, se considera que la invención como es definida en las reivindicaciones cumple con los criterios mencionados en el Artículo 33 (1) PCT, esto es, aparenta ser novedosa, tener nivel inventivo y ser aplicable industrialmente..

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

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

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BAK, Mary, E.
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P.O. Box 457
Spring House, PA 19477
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

21 February 2002 (21.02.02)

Applicant's or agent's file reference

CEL28PCT

International application No.

PCT/US01/23149

International filing date (day/month/year)

23 July 2001 (23.07.01)

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address

BASU, Rahul
572 Dockery Lane
Fayetteville, AR 72702
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

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

BASU, Rahul
572 Dockery Lane
Fayetteville, AR 72702
United States of America

State of Nationality

IN

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

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

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Anne BEUCHAT

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

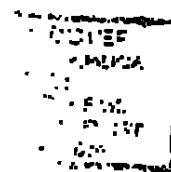
(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BAK, Mary, E.
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P.O. Box 457
Spring House, PA 19477
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 22 October 2001 (22.10.01)			
Applicant's or agent's file reference CEL28PCT	IMPORTANT NOTIFICATION		
International application No. PCT/US01/23149	International filing date (day/month/year) 23 July 2001 (23.07.01)		
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 25 July 2000 (25.07.00)		
Applicant BIOENGINEERING RESOURCES, INC. et al			
1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b). 2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents. 3. 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). In such a case, 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. 4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, 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.			
<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
25 July 2000 (25.07.00)	60/220,794	US	04 Sept 2001 (04.09.01)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Authorized officer Taieb AKREMI	
Facsimile No. (41-22) 740.14.35		Telephone No. (41-22) 338.83.38	



MÉTODOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE UNA FERMENTACIÓN MICROBIANA -----

CAMPO DE INVENCION -----

La presente invención se refiere a mejoras en los métodos de fermentación microbiana para la producción de etanol a partir de un sustrato gaseoso, que contiene por lo menos un gas reductor, utilizando bacterias acetogénicas anaeróbicas (o facultativas). -----

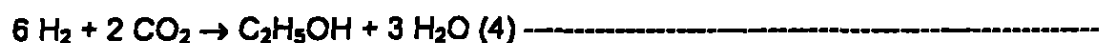
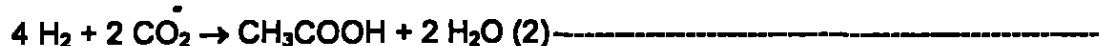
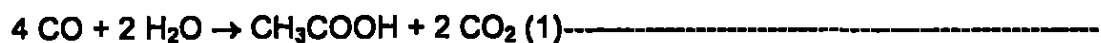
ANTECEDENTES DE LA INVENCION -----

Los inventores de la presente han descripto métodos para producir etanol, entre otros ácidos orgánicos, alcoholes, hidrógeno y sales de ácidos orgánicos, a partir de la fermentación microbiana de sustratos gaseosos en medios que contienen nutrientes y minerales traza adecuados usando determinadas bacterias anaeróbicas. Por ejemplo, los inventores de la presente describieron anteriormente la introducción de mezclas de gases diluidos en un biorreactor que contenía una o varias cepas de bacterias anaeróbicas capaces de utilizar los componentes de gases residuales en una vía directa para producir el compuesto deseado. El compuesto se recupera de la fase acuosa en uno o varios recipientes, utilizando un método de recuperación adecuado para el compuesto producido. Los ejemplos de métodos de recuperación incluyen extracción, destilación o combinaciones de los mismos u otros métodos de recuperación eficientes. Las bacterias se pueden separar de la fase acuosa y reciclar en el biorreactor con el fin de mantener concentraciones celulares altas, maximizando de esa manera la productividad. La separación de células, si se deseara, se lleva a cabo por centrifugación, filtración por

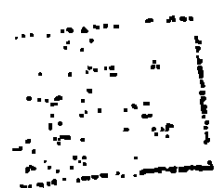


membranas u otras técnicas. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N°: W098/00558, publicada el 8 de enero, 1998; la Patente de EE.UU. N°: 5.807.722; la Patente de EE.UU. N°: 5.593.886 y la Patente de EE.UU. N°: 5.821.111.-----

Además del producto principal, ácido acético, las cepas de la bacteria anaeróbica *Clostridium ljungdahlii* también tienen la capacidad para producir etanol como producto en la conversión de monóxido de carbono (CO), hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂). La producción de ácido acético (CH₃COOH) y etanol (C₂H₅OH) a partir de CO, CO₂ e H₂ se muestra en las siguientes ecuaciones estequiométricas generales: -----



Algunos ejemplos de cepas de *C. ljungdahlii* incluyen la cepa PETC (Patente de EE.UU. N°: 5.173.429); la cepa ERI2 (Patente de EE.UU. N°: 5.593.886) y las cepas C-01 y O-52 (Patente de EE.UU. N°: 6.136.577). Estas cepas están depositadas en American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209, con los N° Acceso: 55383 (anteriormente ATCC N° 49587), 55380, 55988 y 55989, respectivamente. Cada una de las cepas de *C. ljungdahlii* es una bacteria anaeróbica, Gram-positiva con un contenido de los nucleótidos guanina y citosina (G+C) de aproximadamente 22 mol%. Estas bacterias utilizan una variedad de sustratos para su crecimiento, pero no metanol o lactato. Estas cepas difieren en su tolerancia al CO, velocidad de captación de gases específica y productividad



específica. En las cepas "de tipo salvaje" encontradas en la naturaleza, se observa muy poca producción de etanol. Las cepas de *C. ljungdahlii* funcionan idealmente a 37 °C y producen típicamente una relación de etanol a acetilo (es decir, con referencia tanto al ácido acético libre o molecular como a las sales de acetato) de aproximadamente 1:20 (1 parte etanol por 20 partes de acetilo) en el estado "salvaje". Las concentraciones de etanol son típicamente de tan solo 1-2 g/l. En tanto esta capacidad para producir etanol es de interés, dada la baja productividad de etanol las bacterias "de tipo salvaje" no se pueden utilizar para producir un etanol económicamente rentable sobre una base comercial. -----

Las cepas de *C. ljungdahlii* mencionadas previamente se han utilizado, con una manipulación mínima de nutrientes, para producir etanol y acetilo con una relación de producto de 1:1 (partes iguales de etanol y acetilo), pero la concentración de etanol es menor que 10 g/l, un nivel que da como resultado una baja productividad, por debajo de 10 g/l·día. Además, la estabilidad del cultivo constituye un tema en si mismo, primariamente debido a la concentración relativamente alta (8-10 g/l) de acetilo (2,5-3 g/l ácido acético molecular) en combinación con la presencia de etanol. Aún más, a medida que se aumenta la velocidad del gas en un esfuerzo por producir más etanol, se inhibe el cultivo, primero por el ácido acético molecular y luego por CO. Como resultado de ello, el cultivo se vuelve inestable y fracasa en captar el gas y producir el producto adicional. Además, en trabajos anteriores los autores tuvieron dificultades para obtener una relación mayor que 2:1 de etanol a acetilo en una operación de estado estacionario. Véase, por ejemplo, Klasson et al., 1990 *Applied Biochemistry and Biotechnology, Proceedings of the 11th*

Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2: 1125: 857; Phillips et al., 1993 *Applied Biochemistry and Biotechnology, Proceedings of the 14th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 39/40: 559, entre otros.

Existe una gran cantidad de documentos en los cuales se describe el uso de bacterias anaeróbicas, distintas de *C. ljungdahlii*, en la fermentación de azúcares sin consumo de CO, CO₂ e H₂ para producir solventes. En un intento por proporcionar rendimientos altos de etanol, se alteraron diversos parámetros que incluyen: tipos de nutrientes, microorganismos, adición específica de agentes reductores, variaciones en el pH y la adición de gases exógenos. Véase, por ejemplo, Rothstein et al, 1986 *J. Bacteriol.*, 163(1): 319-320; Lovitt et al, 1988 *J. Bacteriol.*, 170(6): 2809; Taherzadeh et al, 1996 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 176. -----

En el arte persiste la necesidad de manejar sustratos gaseosos industriales, para poder extraer productos básicos valiosos de dichos gases, en particular gases residuales, tales como H₂, CO y CO₂. Persiste también la necesidad de mejorar la producción de etanol con relación a la producción de los otros productos que habitualmente son generados por la fermentación de dichos gases por acción de bacterias acetogénicas. -----

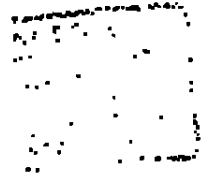
RESUMEN DE LA INVENCION -----

Como respuesta a dicha necesidad en el arte, la presente invención provee métodos novedosos que son continuos, de estado estacionario y que dan como resultado concentraciones de etanol mayores que 10 g/l y concentraciones de acetato menores que aproximadamente 8-10 g/l, logrando al mismo tiempo la continuación del crecimiento del cultivo y una buena estabilidad del mismo. -----



En un aspecto, la invención provee un método estacionario continuo para la producción de etanol a partir de la fermentación bacteriana anaeróbica de un sustrato gaseoso. El método comprende los pasos de cultivar, en un biorreactor de fermentación anaeróbica, bacterias acetogénicas en un medio nutriente líquido y suministrar en el biorreactor un sustrato gaseoso que comprende por lo menos un gas reductor seleccionado del grupo formado por CO e H₂. Las bacterias presentes en el biorreactor son manipuladas por reducción del potencial redox o por aumento de la relación NAD(P)H a NAD(P), en el caldo de fermentación después que las bacterias alcanzan un estado estacionario, por ejemplo, una concentración celular estable, en el biorreactor. La concentración de ácido acético libre en el biorreactor se mantiene en un nivel menor que 5 g/l de ácido libre. Los pasos de cultivo y manipulación causan que las bacterias presentes en el biorreactor produzcan etanol en el caldo de fermentación con niveles de productividad mayores que 10 g/l por día. En el caldo de fermentación se produce tanto etanol como acetato con una relación de etanol a acetato que varía en un rango de 1:1 a 20:1. -----

En una realización de este método, el paso de manipulación incluye uno o varios de los siguientes pasos: alteración de por lo menos un parámetro seleccionado del grupo formado por contenido del medio de nutrientes, velocidad de alimentación de los nutrientes, velocidad de alimentación del medio acuoso, presión de operación, pH de operación, contenido del sustrato gaseoso, velocidad de alimentación de gases, velocidad de agitación del caldo de fermentación, paso de inhibición por producto, densidad de células e inhibición por sustrato. -----



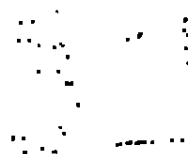
En otra realización de este método, el paso de manipulación comprende el suministro a dicho biorreactor de dicho sustrato gaseoso que comprende el gas reductor, CO, a la velocidad de captación deseada. Esta velocidad es, convenientemente, de 0,3 a 2 mmol CO/gramo de células secas de bacterias en dicho biorreactor/minuto. -----

En otra realización más de este método, el paso de manipulación comprende la alimentación en dicho biorreactor de fermentación de dicho medio de nutrientes que comprende una cantidad limitante de pantotenato de calcio. El pantotenato de calcio se encuentra, convenientemente, en un rango de 0,5 a 50 kg/gramo de células bacterianas secas producidas en el biorreactor. -----

En aún otro aspecto, la invención provee otra realización del método que incluye el suministro de un exceso de gas reductor H₂ a dicho biorreactor antes de incorporar la cantidad limitante de pantotenato de calcio. -----

En aún otro aspecto adicional, la invención provee un método en el cual el paso de manipulación del método incluye la alimentación en dicho biorreactor de fermentación de un medio de nutrientes que comprende una cantidad limitante de cobalto. Convenientemente, la cantidad de cobalto se encuentra en un rango de 5 a 100 µg de cobalto/gramo de células bacterianas secas producidas en dicho biorreactor. -----

En otra realización, el método de la invención incluye el impedimento de la adaptación de dichas bacterias en dicho biorreactor a dicha cantidad de cobalto manteniendo la concentración de cobalto constante y ajustando uno o varios parámetros adicionales, tal como la velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación y presión parcial de H₂ gaseoso. -----

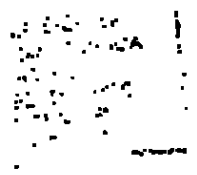


Otros pasos optativos de estos métodos incluyen centrifugar una muestra del caldo con el fin de eliminar las células y monitorear mediante cromatografía gaseosa el mantenimiento de los valores de la relación y/o productividad. -----

En otra realización, el método comprende alimentar como sustrato gaseoso una cantidad de H_2 en ligero exceso con relación a la cantidad estequiométrica para la producción de etanol. En otra realización más, el sustrato gaseoso comprende además una cantidad de CO en ligero exceso con relación a las cantidades requeridas por las bacterias, donde se inhibe la captación de H_2 por las bacterias y se incrementa la relación de NAD(P)H a NAD(P) en el caldo. -----

En aún otra realización del método, se provee un paso en el cual se reduce la inhibición por ácido acético molecular mediante un incremento en la velocidad de alimentación del medio acuoso cuando la cantidad de ácido acético molecular presente en el caldo de fermentación se acerca o excede los 2 g/l. -----

En otra realización del método, el paso de manipulación puede incluir la agitación del medio, bacterias y sustrato gaseoso en el biorreactor a una velocidad de agitación seleccionada. Por ejemplo, una reducción en la velocidad de agitación reduce la cantidad de CO transferido al caldo de fermentación. Esta reducción en la velocidad de transferencia de CO causa un incremento en la conversión de H_2 , de manera tal que el gas reductor, H_2 , está presente en el biorreactor en un exceso con relación a los requerimientos de crecimiento de las bacterias. La velocidad del gas también se puede reducir de manera similar para disminuir la cantidad de CO transferido, incrementando de



esa manera la conversión de H_2 , de modo que el gas reductor, H_2 , está presente en el biorreactor de fermentación en exceso con relación a los requerimientos de crecimiento de las bacterias. -----

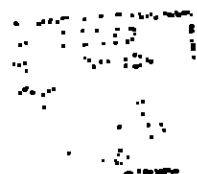
En otra realización más del método, el cultivo bacteriano se puede llevar inicialmente a la concentración celular deseada en el biorreactor antes de limitar la concentración de pantotenato de calcio o cobalto en el medio de nutrientes.-----

En otra realización del método de esta invención, se usa un CSTR de dos etapas (biorreactor) que consiste de un reactor de crecimiento que alimenta el caldo de fermentación a un reactor de producción en el cual se produce la mayor parte del etanol.-----

En otro aspecto de la invención, el método descrito anteriormente incluye los pasos optativos de recuperar etanol por separación del caldo de fermentación del biorreactor; destilación del etanol a partir del caldo; y recuperación del etanol. Además, o preferentemente, se centrifuga una muestra de caldo con el fin de eliminar las células; y luego se monitorea esta relación utilizando cromatografía gaseosa.-----

En aún otro aspecto, el método de la invención puede emplear además un paso adicional de reciclaje de agua (que contiene hasta 5 g/l de acetilo) desde la producción de etanol de vuelta al reactor de modo que se establece un equilibrio entre el etanol y el acetilo en el reactor. Como resultado de ello, una mayor cantidad del CO , CO_2 e H_2 alimentado al reactor y convertido en producto da como resultado mayor producción de etanol.-----

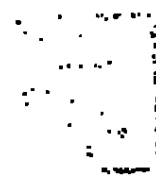
Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la misma. ----



DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que ilustra un método de fermentación continua con una recuperación de producto acorde con esta invención. El sustrato gaseoso 1 y el medio de nutrientes en fase líquida 2 alimentan al biorreactor 3 que contiene el cultivo bacteriano de la invención. La conversión del sustrato gaseoso en etanol y ácido acético tiene lugar en el biorreactor 3. El gas de residual 4 que contiene gases distintos de CO, CO₂ e H₂ y CO, CO₂ e H₂ no convertido del biorreactor 3 se ventea, se quema como combustible o se quema al aire. Con el reciclaje de células, el efluente líquido 5 se envía a un separador de células 6 en el cual se separan las células 7 y el permeato libre de células 8. Las células 7 se vuelven a enviar al biorreactor 3 y el permeato 8 se envía a recuperación de producto. El etanol se puede recuperar del permeato 8 (o, como alternativa, del efluente 5 si no se emplea separación de células). El permeato 8 se separa en la columna de destilación 9 para producir etanol 95% en la cabeza de la destilación 10 y agua 11 que se recicla hacia el biorreactor 3. El etanol 95% en la cabeza de la destilación 10 se envía a un tamiz molecular 12 donde el etanol anhidro 13, el producto final deseado, es separado del etanol diluido 14 que se vuelve a enviar a la columna de destilación 9.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de un sistema de reactor de agitación continua, de dos etapas (CSTR) para una mayor estabilidad en el cultivo. Se introduce el medio líquido 2 en el CSTR 1 de etapa de crecimiento. El gas no convertido 3 del CSTR de etapa de producción se introduce en el CSTR 1 de etapa de crecimiento. En el CSTR de etapa de producción 4 se introduce una alimentación nueva de gas 5 y de medio nuevo 6, así como la



alimentación de cultivo 7 del CSTR 1 de etapa de crecimiento. El reciclador celular 8 se usa para obtener la mayor parte de la producción de las células 9 enviadas al CSTR de etapa de producción 4. Las células 9 no se reciclan al CSTR de etapa de crecimiento. El producto líquido 10 que consiste de etanol diluido en el caldo de fermentación se obtiene como el producto de destilación final y se recupera como etanol anhidro tal como en la Fig. 1.-----

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION -----

La presente invención involucra métodos para una fermentación anaeróbica de sustratos gaseosos que contienen por lo menos un gas reductor, en particular los componentes gaseosos de los desechos industriales y los gases de síntesis (por ejemplo CO , CO_2 e H_2) para obtener etanol. Estos métodos permiten productividades de etanol mayores que 10 g/l-día gracias a la manipulación de las vías biológicas de las bacterias de la invención. Un método de la invención causa una abundancia de NAD(P)H con respecto a NAD(P) . La oxidación de NAD(P)H en NAD(P) provoca la reducción del ácido acético producido por el cultivo en etanol. Como alternativa, otros métodos para la producción de concentraciones altas de etanol en la fermentación anaeróbica de esta invención comprenden la reducción del potencial redox del caldo de fermentación y de esa manera la reducción de ácido acético en etanol. Los métodos de esta invención producen concentraciones altas de etanol (es decir, mayores que aproximadamente 10 g/l, y preferentemente mayores que aproximadamente 15 g/l) y concentraciones bajas de acetato (es decir, menores que aproximadamente 5 g/l de ácido acético libre en el biorreactor). Estos métodos también mantienen y controlan las condiciones de los métodos para la producción continua de etanol y ácido acético con el fin de ayudar en la

recuperación rápida del sistema de eventuales desviaciones del método. Además, los métodos de esta invención ayudan a prevenir la adaptación del cultivo a una concentración baja de nutrientes, que puede ser nociva para el rendimiento del cultivo. La presente invención provee un método comercial viable para la producción de etanol. -----

I. Definiciones -----

A menos que se defina lo contrario, los siguientes términos se utilizan en toda la memoria descriptiva como se describe a continuación. -----

El término "método continuo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un método de fermentación que incluye una alimentación continua de nutrientes, una alimentación continua de sustrato, una producción continua de células en el biorreactor, la eliminación continua de células (o purga) del biorreactor y la separación continua del producto. Estas alimentaciones, separaciones o producción de células continua puede tener lugar en el mismo flujo o en flujos diferentes. Un proceso continuo da como resultado la obtención de un estado estacionario dentro del biorreactor. El término "estado estacionario" significa que todas estas variables mensurables (es decir, velocidades de alimentación, concentraciones de sustrato y nutrientes mantenidas en el biorreactor, concentración de células en el biorreactor y separación de células del biorreactor, separación de producto del biorreactor, así como variables condicionales, tal como temperaturas y presiones) son constantes en el tiempo. -----

El término "sustratos gaseosos", tal como se utiliza en este documento, significa CO solamente, CO e H₂, CO₂ e H₂ o CO, CO₂ e H₂, mezclados optativamente con otros elementos o compuestos, incluyendo nitrógeno y

metano en estado gaseoso. Dichos sustratos gaseosos incluyen gases o flujos, que típicamente son liberados o descartados hacia la atmósfera, ya sea de forma directa o por medio de una combustión. En algunas realizaciones de este método, el sustrato gaseoso comprende CO. En otras realizaciones de este método, el sustrato gaseoso comprende CO₂ e H₂. En aún otras realizaciones, el sustrato gaseoso comprende CO e H₂. En una realización particularmente preferida, el sustrato gaseoso comprende CO, CO₂ e H₂. Aún otros sustratos de la invención pueden incluir los componentes mencionados previamente y por lo menos un gas de nitrógeno, CO₂, etano y metano. Por lo tanto, dichos sustratos incluyen los que convencionalmente se denominan "syngas" o gases de síntesis provenientes de la gasificación de productos de carbono (incluyendo el metano), así como gases residuales de diversos métodos industriales.-----

El término "gas reductor" significa CO o H₂ o ambos. La frase "una cantidad de gas reductor mayor que la requerida para el crecimiento de las bacterias" significa una cantidad de gas reductor que excede la cantidad que las bacterias pueden usar para su crecimiento o metabolismo, dados los ingredientes del medio de nutrientes. Esta cantidad se puede lograr incrementando la cantidad neta de gas reductor o reduciendo los ingredientes de nutrientes clave, de modo que el exceso de la cantidad de gas se logra sin incrementar el gas, o incrementando la velocidad de administración de gases a las bacterias. Cuando las bacterias son expuestas a más gas reductor que el necesario para su crecimiento, las bacterias responden incrementando la producción de etanol.-----



Las "bacterias de la invención" son bacterias acetogénicas anaeróbicas (o facultativas), que tienen la capacidad para convertir CO y agua o H₂ y CO₂ en los productos etanol y ácido acético. Las bacterias que son de utilidad de acuerdo con esta invención incluyen, sin limitaciones, *Acetogenium kiwi*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium noterae*, *Clostridium aceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *C. acetobutylicum*, *C. thermoaceticum*, *Eubacterium limosum*, *C. ljungdahlii* PETC, *C. ljungdahlii* ER12, *C. ljungdahlii* C-01, *C. ljungdahlii* O-52 y *Peptostreptococcus productus*. Los especialistas en el arte sabrán seleccionar otras bacterias acetogénicas anaeróbicas para su uso en estos métodos. _____

El término "cepas mixtas" significa un cultivo mixto de dos o varias de las bacterias de la invención. Dichas "cepas mixtas" de las bacterias enumeradas previamente en este documento se utilizan en los métodos de esta invención. --

Los términos "biorreactor", "reactor" o "biorreactor de fermentación" incluyen un dispositivo de fermentación que consiste de uno o varios recipientes y/o torres o disposición de tuberías, que incluye un Reactor continuo de mezcla completa (CSTR), Reactor de Células Inmovilizadas (ICR), Reactor de lecho arrastrado (TBR), Columna de burbujeo, Fermentadores elevados para gases, mezclador estático u otros dispositivos adecuados para un contacto gas-líquido. Preferentemente, para el método de esta invención, el biorreactor de fermentación comprende un reactor de crecimiento que alimenta el caldo de fermentación a un segundo biorreactor de fermentación, en el cual se produce la mayor parte del producto, etanol. _____

El término "medio de nutrientes" se usa en general para describir un medio de crecimiento para bacterias convencional que contiene suficientes



vitaminas y minerales como para permitir el crecimiento de las bacterias de la invención seleccionadas. No se incluyen azúcares en estos medios. Los componentes de diversos medios de nutrientes adecuados para el uso de esta invención son conocidos y están descriptos en publicaciones anteriores, incluyendo las de los inventores. Véase, por ejemplo las fórmulas de medios de nutrientes descriptos en la Solicitud de Patente Internacional N°: W098/00558; Patente de EE.UU. N°: 5.807.722; Patente de EE.UU. N°: 5.593.886 y Patente de EE.UU. N°: 5.821.111, así como en las publicaciones identificadas previamente. De acuerdo con la presente invención, un medio de nutrientes de laboratorio típico para la producción de acetato a partir de CO, CO₂ e H₂ contiene 0,9 mg/l de pantotenato de calcio. Sin embargo, un medio de nutrientes de laboratorio típico para la producción de etanol a partir de CO, CO₂ e H₂ contiene 0,02 mg/l de pantotenato de calcio. -----

Los términos "sustrato limitante" o "nutriente limitante", definen una sustancia en el medio de nutrientes o sustrato gaseoso que, durante el crecimiento del cultivo bacteriano en el biorreactor, es agotado por el cultivo hasta un nivel que ya no permite sustentar el estado estacionario o el crecimiento bacteriano estable en el biorreactor. Todas las demás sustancias en el medio de nutrientes o sustrato gaseoso están presentes en exceso y son "no limitantes". La evidencia de la limitación es que un incremento en la velocidad de adición del sustrato limitante, es decir en la velocidad de alimentación de los nutrientes o la velocidad de alimentación de gases, al cultivo causa un incremento correspondiente en la velocidad de captación del gas (mmol/min de gas) debido a un incremento en la densidad de células. -----



A menos que se indique lo contrario, el término "acetato" se utiliza para describir una mezcla de ácido acético molecular o libre y sal acetato presente en el caldo de fermentación. La relación de ácido acético molecular a acetato depende del pH del sistema, es decir, a una concentración constante de "acetato", cuanto menor sea el pH mayor será la concentración de ácido acético molecular con relación a la sal acetato. —————

En esta memoria descriptiva, la "concentración de células" se basa en el peso seco de las bacterias por litro de muestra. La concentración de células se mide directamente o por calibración con una densidad óptica. —————

El término "estado natural" describe cualquier compuesto, elemento o vía que no contiene los electrones o protones adicionales que habitualmente están presentes. A la inversa, el término "estado de reducción" describe cualquier compuesto, elemento o vía que contiene un exceso de uno o varios electrones. El "estado de reducción" se logra con la adición de uno o varios electrones al "estado natural", es decir, con la disminución del potencial redox del caldo de fermentación. —————

La "productividad de etanol" es la productividad volumétrica de etanol, calculada como la relación de la concentración de etanol en estado estacionario y el tiempo de retención de líquidos (LRT) en sistemas continuos o la relación de la concentración de etanol y el tiempo necesario para producir dicha concentración en sistemas por lotes. La frase "productividad alta de etanol" describe una productividad volumétrica de etanol de más de 10 g/l·día. -

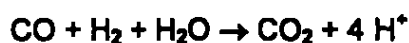
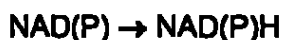
La frase "concentración alta de etanol" significa más de aproximadamente 10 g/l, preferentemente más de 15 g/l de etanol en el caldo de fermentación o una relación de producto de etanol a acetato de 5:1 o más. --

El "H₂ en exceso" está disponible para la producción de etanol cuando la relación de los moles de H₂ en la alimentación de gases a la suma de dos veces los moles de CO convertidos y tres veces los moles de CO₂ convertidos es mayor que 1,0. Si esta relación es menor que 1,0, no hay H₂ en exceso disponible y solamente es posible producir etanol por medio de un mecanismo de control diferente. -----

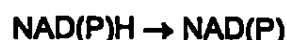
II. *Vías biológicas utilizadas en el método de esta invención* -----

Sin tener en cuenta una teoría particular, los inventores proponen que los métodos para incrementar la producción anaeróbica de etanol de los métodos que se describen en este documento se basan en las vías biológicas que involucran la conversión de NAD(P)H en NAD(P) en los ciclos de vías básicas de la vía acetogénica para un crecimiento autotrófico. La invención involucra la manipulación de dichas vías para permitir una producción y mantenimiento continuos de concentraciones altas de etanol con concentraciones bajas de acetato, bajo condiciones de funcionamiento estacionarios, proporcionando de esa manera métodos que son de utilidad para la producción de etanol a partir de gases industriales. -----

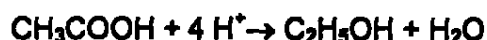
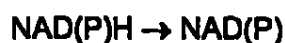
El compromiso esencial de NAD(P)H a NAD(P) en las vías biológicas se describe como sigue: La producción de etanol a partir de componentes gaseosos, tal como CO, CO₂ e H₂ tiene lugar con un método biológico de tres pasos. En el primer paso, se oxidan los sustratos CO e H₂ y, al hacerlo, liberan NAD(P)H: -----



Los productos del paso 1 se convierten entonces en ácido acético, un paso que requiere _____



Finalmente, si hay un exceso de NAD(P)H disponible debido a que la reacción del paso 1 avanza a una velocidad más rápida que la reacción del paso 2, el ácido acético se reduce a etanol. _____



Por consiguiente, la disponibilidad de un exceso NAD(P)H debido a oxidación de sustrato conduce a la producción de etanol a partir de ácido acético. _____

Hay dos ciclos de vías básicas conocidas en la vía acetogénica: (1) el ciclo de la acetil-CoA y (2) el ciclo THF, en los cuales se reduce CO_2 a un grupo metilo. La secuencia para la generación de etanol y ácido acético a partir del mismo se ilustra en J. R. Phillips et al., 1994 *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/46: 145. El ciclo de la acetil-CoA tiene un ciclo interno, denominado ciclo del CO en este documento. Como el ciclo del CO habitualmente reacciona en el sentido de las agujas del reloj, se reduce ferredoxina. La ferredoxina también se puede reducir por H_2 cuando se oxida con la enzima hidrogenasa. Como resultado de ello, el ciclo de la acetil-CoA también reacciona en el sentido de las agujas del reloj y se oxida la ferredoxina. Si el ciclo de CO interno y el ciclo de acetil-CoA reaccionan a las mismas velocidades, la ferredoxina se encuentra en un estado de equilibrio

redox. Sin embargo, si estos dos ciclos no tienen lugar a las mismas velocidades, es decir, el ciclo del CO reacciona a una velocidad mayor que el ciclo de la acetil-CoA, se acumula ferredoxina reducida. Además, con un exceso de H₂, también se puede producir un exceso de ferredoxina. Este exceso de ferredoxina reducida causa una regeneración (reducción) de NAD(P) en NAD(P)H, que se acumula en un exceso que debe ser llevado a equilibrio y al hacerlo, reduce el ácido acético en etanol.-----

El ciclo de THF funciona en el crecimiento celular y es necesario para un cultivo continuo; por ello no es posible detenerlo por completo. La reducción de la velocidad del ciclo de THF también sirve para lograr una relación mayor de NAD(P)H a NAD(P). El NAD(P)H se oxida en dos lugares. Al limitar esta oxidación, que mantendría la relación celular total de NAD(P)H a NAD(P) en equilibrio, el NAD(P)H se usa para reducir ácido acético en etanol. -----

Un segundo método básico para reducir ácido acético a etanol es por disminución directa del potencial redox del caldo de fermentación. Un estado de reducción suficientemente inferior al estado natural del cultivo permite obtener abundante NAD(P)H y promueve la reducción de ácido acético en etanol.-----

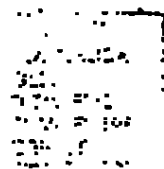
III. Los métodos de la invención -----

Los pasos básicos del método incluyen lo siguiente: Se describirá un método de fermentación continua con recuperación de producto con referencia a la Fig. 1 y ejemplificado en el Ejemplo 1, más adelante. Se suministra un flujo continuo de sustrato gaseoso 1 que comprende por lo menos un gas reductor, por ejemplo, CO o H₂, a una velocidad de alimentación de gases seleccionada, y un flujo continuo de medio de nutrientes en fase líquida 2, a una velocidad de



alimentación de nutrientes seleccionada, en un biorreactor de fermentación 3 que contiene las bacterias de la invención. En el biorreactor 3, el medio y el sustrato gaseoso son fermentados por las bacterias para producir etanol y acetato ácido. Una vez que se logró una concentración estable de células bajo condiciones de estado estacionario, se manipulan los componentes del sistema continuo para reducir el potencial redox o incrementar la relación de NAD(P)H a NAD(P) en el caldo de fermentación, manteniendo al mismo tiempo la concentración de ácido acético libre en el biorreactor por debajo de 5 g/l. Los métodos de esta invención están diseñados para permitir y mantener una producción de etanol y acetato en el caldo de fermentación de manera tal que la productividad de etanol sea mayor que 10 g/l·día con una relación de etanol a acetato de entre 1:1 y 20:1. En una realización, dicha relación es mayor que 3:1. En otra realización, dicha relación es mayor que 5:1. En aún otra realización, dicha relación es mayor que 10:1. En otra realización más, dicha relación es mayor que 15:1. El método de esta invención es alternativamente efectivo para mejorar la producción estable continua (de estado estacionario) de concentraciones altas de etanol (15-35 g/l etanol) y concentraciones bajas de acetato (0-5 g/l acetato), es decir, una relación de producto etanol a acetato de 3:1 o más, a partir de CO, CO₂ e H₂ con una buena estabilidad de método.--

Periódicamente, durante el desarrollo de los métodos de esta invención, se retiran muestras del caldo para determinar dicha relación con un método de ensayo convencional. Por ejemplo, las células se separan de la muestra, por ejemplo, por centrifugación, y la muestra libre de células es sometida a un método de ensayo, tal como el método preferido de cromatografía gaseosa. Sin embargo, el especialista en el arte puede seleccionar otros métodos de ensayo



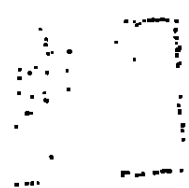
convencionales. Se agregan pasos optativos adicionales del método para lograr y/o mantener dicha relación. En el Ejemplo 2 se describe un método de ensayo.

Los pasos usados para manipular los componentes del sistema y mantener y/o lograr la productividad de etanol o la relación etanol a acetato deseada incluyen por lo menos uno, y convenientemente, combinaciones de los siguientes pasos: alterar el contenido del medio de nutrientes, la velocidad de alimentación de los nutrientes, la velocidad de alimentación del medio acuoso, la presión de operación, el pH de la operación, el contenido del sustrato gaseoso, la velocidad de alimentación de gases, la velocidad de agitación del caldo de fermentación; evitar el paso de inhibición por producto; disminuir la densidad de células en el biorreactor; o prevenir la inhibición por sustrato. Algunas manipulaciones preferidas incluyen limitar, en el biorreactor, los nutrientes en fase líquida (pantotenato o cobalto), suministrar un ligero exceso de CO e H₂ en el gas de alimentación, minimizar la concentración de acetato, evitar la adaptación del cultivo a concentraciones bajas de nutrientes en fase líquida, llevar el cultivo a una concentración de células adecuada a una velocidad relativamente rápida, elevar el pH del cultivo por encima de 4,5, purgar las células bacterianas del biorreactor hasta una concentración de células menor que la concentración estable del estado estacionario que utiliza todo el sustrato de gas reductor o de nutrientes en el biorreactor e incrementar la velocidad de alimentación del medio acuoso cuando la porción de ácido acético libre del acetato presente en el caldo del biorreactor de fermentación excede los 2 g/l, inhibiendo de esa manera cualquier incremento no deseado en la

concentración de ácido acético libre. Todos estos pasos se describen con detalle a continuación.-----

El gas de escape 4, que contiene gases distintos de CO, CO₂ e H₂ y CO, CO₂ e H₂ no convertidos del reactor, es venteado del reactor y se usa por su valor como combustible. Si se emplea un exceso de H₂ como mecanismo de control, se utiliza la presión parcial de H₂ en el gas de salida y la relación de presión parcial de H₂ a presión parcial de CO₂ en el gas de salida para identificar el control de la relación etanol a acetato por dicho paso. El reciclaje de células se usa (pero no es un requisito) para incrementar la concentración de células dentro del biorreactor y de esa manera provee más biocatalizador para la conversión de CO, CO₂ e H₂. Con el reciclaje de células, el efluente líquido del reactor 5 se envía al separador de células 6 donde se separan las células 7 y el permeato (líquido libre de células) 8. Las células 7 se envían nuevamente al biorreactor y el permeato 8 se envía a recuperación de producto. -----

La separación de células se lleva a cabo utilizando una centrífuga continua, un sistema de filtración de fibras huecas o en espiral, un sistema de filtros de cerámica u otro separador sólido/líquido. El etanol se puede recuperar del permeato (o, como alternativa, del efluente del reactor 5 si no se emplea separación de células) empleando diversas técnicas incluyendo destilación y adsorción. El permeato 8 se separa en una columna de destilación para producir etanol 95% en la cabeza de destilación 10 y agua 11 que se recicla hacia el reactor 3. El agua de reciclaje 11 contiene un exceso de nutrientes que no se usaron en la fermentación, pero todo exceso de vitaminas de la fermentación o de la lisis celular es destruido por la destilación térmica. El



etanol 95% en la cabeza de destilación 10 se envía a un tamiz molecular 12 donde el etanol anhidro 13, el producto final deseado, es separado del etanol diluido 14 que se vuelve a enviar a la columna de destilación 9.-----

La combinación de crecimiento, muerte y purga de células continua mantiene una concentración constante de células, de manera tal que el método continuo usado para producir etanol (y pequeñas cantidades de ácido acético) pueda funcionar durante muchos meses con la simple alimentación de CO, CO₂ e H₂, junto con nutrientes sin suplementos de cultivo adicionales. Los métodos de esta invención mantienen y controlan las condiciones para una producción continua de etanol y ácido acético e impiden o corrigen rápidamente las desviaciones del método. Los métodos de esta invención también ayudan a prevenir la adaptación del cultivo a una concentración baja de nutrientes, la cual puede ser nociva para el rendimiento del cultivo. En las siguientes descripciones y en los ejemplos, a menos que se indique lo contrario, la presión usada es de 1 atmósfera y la temperatura usada es de entre 36-41 °C. El especialista en el arte puede determinar las temperaturas y presiones deseables, según el microorganismo seleccionado para su uso en el biorreactor.-----

Diversas manipulaciones, que se describen específicamente más adelante, además de los pasos básicos de esta invención, permiten lograr una producción mejorada de etanol. Preferentemente, la limitación de nutrientes en fase líquida (pantotenato o cobalto) o el uso de un exceso de H₂ o CO son los pasos del método de la invención, descrito con detalle a continuación, que se usan para alcanzar y mantener la productividad deseada de etanol y permitir la producción de concentraciones y relaciones de etanol a acetato estables en el

caldo de fermentación. Estas condiciones permiten producir concentraciones estables de etanol y acetato en el caldo de fermentación. En una realización preferida, la relación de producto etanol a acetato producido en el caldo de fermentación es mayor que 1,0:1 y la concentración de etanol es mayor que 15 g/l. _____

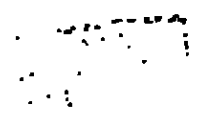
A. Limitación por pantotenato de calcio _____

En una realización específica de esta invención, el método para manipular las vías biológicas para favorecer la producción de etanol y limitar la producción de ácido acético comprende limitar la cantidad de pantotenato de calcio en el medio de nutrientes a una cantidad que sea menor que la requerida para mantener las bacterias a una concentración estable, de estado estacionario que emplearía por completo el pantotenato de calcio provisto. El pantotenato es un componente de la acetil-CoA y por ello, al limitar el pantotenato de calcio en el medio de nutrientes, disminuye la velocidad del ciclo de acetil-CoA con relación a la velocidad del ciclo de CO. Esto provoca una acumulación de ferredoxina reducida y la reducción de NAD(P) en NAD(P)H₂ y de esa manera incrementa la producción de etanol como producto final. _____

Se observa limitación de pantotenato cuando los microgramos (µg) de pantotenato de calcio alimentados al reactor por gramo (g) de células (peso seco) producido en el reactor se encuentra en el rango de 0,5 a 100. Una limitación de pantotenato más deseada se encuentra en el rango de 2 a 75 µg de pantotenato de calcio por gramo (g) de células secas producidas en el reactor. Otra limitación preferida de pantotenato se encuentra en el rango de 0,5 a 50 µg de pantotenato de calcio por gramo (g) de células producidas en el

reactor. Otra realización de esta limitación es de aproximadamente 1-25 μg de pantotenato de calcio por gramo (g) de células producidas en el reactor. Otra realización de esta limitación es de aproximadamente 10-30 μg de pantotenato de calcio por gramo (g) de células producidas en el reactor. Esta cantidad de nutrientes mantiene una producción preferencial de etanol con respecto a la producción de acetato. Una realización de este método se ilustra en el Ejemplo 4.

En otro aspecto de este método, se evita la adaptación de las bacterias en el biorreactor de fermentación a concentraciones limitantes bajas de pantotenato de calcio regulando o ajustando los parámetros de la fermentación, de manera tal que se mantiene una concentración constante de pantotenato de calcio, en tanto se ajusta por lo menos uno, y a veces más de uno, de los parámetros de velocidad de alimentación de gases, velocidad de alimentación líquida, velocidad de agitación o presión parcial de H_2 . Se evita efectuar cambios importantes en los nutrientes, pero se mantiene una concentración de nutrientes en la alimentación relativamente constante. Si se permite la adaptación del cultivo a bajas concentraciones limitantes de nutrientes en fase líquida, se produce una relación pobre de productos de 1,0 g etanol/g acetato o menos en un método irreversible. Por lo tanto, será necesario detener el reactor y una reinoculación del mismo. Preferentemente, se controla la vía biológica para favorecer la producción de etanol y limitar la producción de ácido acético suministrando primero un exceso de H_2 en la alimentación de gases al biorreactor y luego pantotenato de calcio limitante en el medio de nutrientes como se describió previamente.

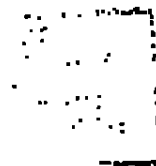


De hecho, en el momento del arranque se mantiene un exceso del pantotenato de calcio en los nutrientes en fase líquida, habitualmente limitante, con el fin de evitar la adaptación a bajas concentraciones de nutrientes, una condición que puede dar como resultado un rendimiento muy pobre y la pérdida de la capacidad del cultivo para lograr una productividad alta de etanol de más de 10 g/l·día si no se emplea un exceso de H_2 . Un ejemplo de dicha regulación de los parámetros de la fermentación para un cultivo bacteriano particular se ilustra en el Ejemplo 17. -----

B. Limitación por cobalto-----

En otra realización de esta invención, el método para manipular las vías biológicas para favorecer la producción de etanol y limitar la producción de ácido acético involucra una limitación de la cantidad de cobalto en el medio de nutrientes hasta una cantidad que sea menor que la requerida para mantener las bacterias a una concentración estable de estado estacionario que emplearía por completo el cobalto provisto. Se observa una limitación por cobalto cuando los microgramos (μg) de cobalto alimentados al reactor por gramo (g) de células (peso seco) producidas en el biorreactor se encuentra en el rango de 5 a 100. Preferentemente, la limitación cobalto comprende entre 20 a 50 μg aproximadamente de cobalto en el reactor por gramo de células producidas en el reactor. Esta cantidad de cobalto mantiene una producción preferencial de etanol con respecto a acetato en el proceso. En el Ejemplo 18 se ilustra una realización del método del cobalto limitante en el reactor de acuerdo con este método. -----

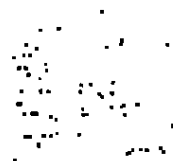
Una limitación del cobalto en el caldo de fermentación también puede reducir la velocidad del ciclo de acetil-CoA. Dado que se usa cobalto para



transferir un grupo metilo del ciclo de THF al ciclo de acetil-CoA, una limitación en la cantidad de cobalto en el caldo de fermentación también reduce la función del ciclo de THF al no permitir dicha transferencia. La limitación de cobalto reduce la velocidad del ciclo de THF, que también es causante de una relación mayor de NAD(P)H a NAD(P), con lo cual se produce etanol.-----

El método se manipula además impidiendo la adaptación a una concentración limitante baja de cobalto. De forma muy similar a la manera de evitar una adaptación a concentraciones bajas de pantotenato, se mantiene una concentración de cobalto constante ajustando al mismo tiempo uno o varios de los parámetros de la fermentación (velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación, contenido de CO₂ y presión parcial de H₂ gaseoso). Se evita en lo posible efectuar grandes cambios en los nutrientes, sino que en su lugar se mantiene una concentración de alimentación de nutrientes relativamente constante. Un ejemplo de dicha regulación de los parámetros de la fermentación para un cultivo bacteriano particular se ilustra en el Ejemplo 19.-----

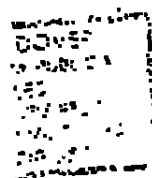
Preferentemente, se controla la vía biológica para favorecer la producción de etanol y limitar la producción de ácido acético suministrando primero un exceso de H₂ en el reactor y luego cobalto limitante en el medio de nutrientes como se describió previamente. Al arranque, se mantiene un exceso del cobalto en los nutrientes en fase líquida habitualmente limitante con el fin de evitar la adaptación a bajas concentraciones de nutrientes, una condición que puede dar como resultado un rendimiento muy pobre y la pérdida de la capacidad del cultivo para producir una relación de productos mayor que 1:1.---



C. Sobrealimentación de hidrógeno

En otra realización adicional, el método para manipular las vías biológicas para favorecer la producción de etanol y limitar producción de ácido acético comprende alimentar un exceso de H_2 en el gas de alimentación o carbono gaseoso limitante que da como resultado un exceso de H_2 , que luego será utilizado por la vía biológica. Preferentemente, el gas reductor H_2 se encuentra en exceso con respecto al CO_2 y dicho exceso de H_2 hace que las bacterias produzcan una relación alta de etanol a acetato en el caldo de fermentación. Si la relación de H_2 (moles de gas alimentado) al doble de CO (en moles de gas) convertidos y al triple de CO_2 (en moles de gas) convertido es mayor que 1, el fermentador está limitado por carbono. La presión parcial de H_2 presente en el gas de escape es preferentemente mayor que 0,4 atm. Finalmente, la relación de presión parcial de H_2 a presión parcial de CO_2 debe ser mayor que 3,0 con el fin de asegurar una disponibilidad suficiente de H_2 para usar todo el CO_2 . Si la presión parcial de CO_2 es mayor que 0,1 atm, es probable que el crecimiento haya sido limitado de otra manera. Véase, el Ejemplo 20 por una ilustración de este paso del método. -----

Durante el arranque, se favorece el uso de un exceso de H_2 ante una limitación de nutrientes, fundamentalmente porque es más sencillo de controlar. Las ventajas del uso de un exceso de H_2 son que evitan la producción de excesos de ácido acético, que puede conducir a una relación pobre de productos y una inhibición potencial de ácido acético, así como a una adaptación a bajas concentraciones de nutrientes. -----



D. Sobrealimentación de monóxido de carbono

Otra manera de manipular los componentes del método, involucra una sobrealimentación del gas reductor, CO, en el sustrato gaseoso para su uso en la vía, que sirve para disminuir directamente el potencial redox en el caldo de fermentación. Por consiguiente, de acuerdo con esta realización, se suministra un sustrato gaseoso en el biorreactor que comprende CO, donde la cantidad de CO presente en el biorreactor es mayor que la cantidad necesaria para mantener las bacterias a una concentración de estado estacionario estable que utilizaría completamente el CO provisto. La sobrealimentación de CO se puede usar como método para favorecer la producción de etanol ante la producción de ácido acético, cuando la velocidad específica de captación de CO (milimoles de CO por gramo de células (peso seco) en el reactor por minuto o mmol/g células/min) es mayor que 0,3. Más preferentemente, este paso involucra una velocidad de captación de CO específica mayor que 0,5. Esto significa que cada célula en promedio está usando CO en su metabolismo a una velocidad de por lo menos 0,3 mmol/g/min, o más idealmente, a una velocidad de por lo menos 0,5 mmol/g/min. Preferentemente, el CO se provee a una velocidad a la cual la captación de CO es de 0,3 a 2 mmol de CO/gramo de célula (peso seco) bacteriana/minuto. En otra realización, el CO se provee a una velocidad de 0,5 a 1,5 mmol de CO/gramo célula (peso seco) bacteriana/minuto. En otra realización, el CO se provee a una velocidad de aproximadamente 1 mmol de CO/gramo de célula (peso seco) bacteriana/minuto. En el Ejemplo 24 se provee una ilustración de una realización de este paso del método.

Esta velocidad de captación de CO mantiene una producción preferencial de etanol con respecto a la producción de acetato. Si el CO se

UNA DONA
CTORA PUN
HABLEE
VPO
EN
1972

suministra de manera tal que el CO disuelto en el caldo de fermentación es significativo por la presión de gas o una transferencia de masa extremadamente buena, el caldo de fermentación se vuelve más reducido. La sobrealimentación de CO presenta dos ventajas adicionales. Un exceso de CO puede provocar que el ciclo de CO funcione a una velocidad más rápida y, si se limita el ciclo de acetil-CoA de otra manera y no puede alcanzar al ciclo de CO, se produce acumulación de ferredoxina. El CO también puede disminuir la velocidad del paso 2 (producción del intermediario ácido acético) en el método general de tres pasos por medio de inhibición del sustrato. Esta menor velocidad del paso 2 con respecto al paso 1 produce un exceso de NAD(P)H_2 que conduce a la producción de etanol en favor de ácido acético. -----

Si bien un exceso de CO puede dar como resultado una mayor producción de etanol por reducción directa del potencial redox del caldo de fermentación, la presencia de dicho exceso de CO también inhibe el crecimiento porque inhibe la CO-deshidrogenasa y por ende la captación de H_2 . Desafortunadamente, la presencia de un exceso de CO también da como resultado una pobre conversión de H_2 , que probablemente no sea económicamente favorable. La consecuencia de un funcionamiento extendido bajo condiciones de inhibición por sustrato es una captación pobre de H_2 . Esto conduce eventualmente a una lisis celular y será necesario volver a arrancar el reactor. Cuando este método lleva a un resultado involuntario de inhibición por sustrato por CO (la presencia de demasiado CO para las células disponibles) durante el crecimiento inicial del cultivo o posteriormente, se reduce la velocidad de alimentación de gases y/o la velocidad de agitación hasta aliviar la inhibición por sustrato. En el Ejemplo 21 se describe una ilustración de la



manera de ajustar la velocidad del gas o la velocidad de agitación para lograr este efecto. _____

E. Pasos de manipulación adicionales _____

Además de los pasos más importantes para mejorar el método que se describieron previamente, se pueden incluir varios pasos en el método de producción de etanol. _____

1. Incremento en la transferencia de masa _____

Una de dichas realizaciones adicionales, comprende asegurar que la transferencia de masa de CO o H₂ de la alimentación de gases al caldo de fermentación líquido sea más rápida que la capacidad de las bacterias para utilizar los gases disueltos. Por ejemplo, si un biorreactor que contiene *C. ljungdahliae* se alimenta con CO, CO₂ e H₂ y se opera sin limitaciones de nutrientes (tal como pantotenato o cobalto) o la presencia de exceso de H₂, el crecimiento celular se limitará por la cantidad de gas transferido a la fase líquida y el sistema produce ácido acético como producto. Si el cultivo recibe una alimentación de un ligero exceso en la cantidad de CO o H₂ que la requerida para el crecimiento del cultivo, producirá etanol. Sin embargo, si se transfiere demasiado gas a la fase líquida para su uso por parte del cultivo, se producirá una inhibición por sustrato, que puede conducir a una alteración del cultivo y la muerte celular. Por consiguiente, hay un rango muy estrecho de operación con un exceso de transferencia de masa. En el Ejemplo 22 se provee una ilustración de este método. _____

Con referencia al ciclo de acetil-CoA, para poder producir un exceso de ferredoxina reducida, el ciclo de CO o la reducción de ferredoxina por una hidrogenasa debe tener lugar a una velocidad mayor que el ciclo de acetil-CoA.

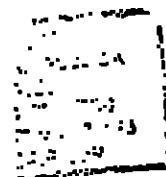
OVER
PUNTA

Los métodos que se describen en este documento limitan la velocidad a la cual los organismos pueden utilizar los gases disueltos por medio de una restricción de la velocidad a la cual los nutrientes esenciales, como por ejemplo pantotenato de calcio o cobalto, u otros sustratos, tal como CO_2 gaseoso, estarán disponibles para las bacterias o por provisión de un exceso de sustrato, H_2 o CO , al cultivo. _____

Se puede calcular una velocidad de transferencia de masa teórica, que es más rápida que la velocidad a la cual las bacterias pueden usar el sustrato, aún sin otras limitaciones. Dicha velocidad, cuando se alcanza, está limitada por la velocidad de crecimiento natural del organismo. Por ello, la realización más productiva es cuando la transferencia de masa (velocidad de flujo gaseoso o velocidad de agitación) es más rápida que la velocidad a la cual la mayor concentración posible de células puede utilizar el sustrato sin ninguna limitación. Habrá un rango de operación muy estrecho dado que la inhibición por sustrato podría llevar rápidamente a la muerte celular y a una concentración de subproductos resultantes que es tóxica para el cultivo.-----

2. Suministro de un exceso de CO e H_2 -----

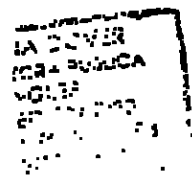
En otra realización del método de esta invención, la estabilidad en la concentración alta de etanol/producción limitada de ácido acético se logra con aquellos métodos que limitan el cobalto o pantotenato de calcio o que proveen abundante H_2 o CO . De acuerdo con este paso, a medida que el cultivo utiliza los sustratos gaseosos CO , H_2 y CO_2 , como fuentes de carbono y energía, se suministra CO e H_2 con un ligero exceso. El exceso ligero de CO e H_2 se logra alcanzando una operación estacionaria y luego incrementando gradualmente la velocidad de alimentación de gases y/o la velocidad de agitación (incrementos



del 10% o menos) hasta que las conversiones de CO e H₂ comienzan a declinar. Esto constituye un medio para evitar la limitación por transferencia de masa, que favorece la producción de ácido acético, y suministrar un exceso de ferredoxina reducida con el fin de reducir NAD(P) a NAD(P)H y producir etanol. Si no se suministra un ligero exceso de CO e H₂, se produce una limitación por transferencia de masa, y se equilibra la vía. Esto da como resultado una pobre relación de productos etanol a acetato (concentraciones altas de acetato). Las concentraciones altas de acetato pueden, en última instancia, dar como resultado una inhibición de ácido acético, que limita la capacidad de las bacterias para captar H₂ y eventualmente puede conducir al deterioro del cultivo. -----

Los pasos para evitar una limitación por transferencia de masa incluyen un incremento en la velocidad de agitación o en la velocidad del gas para transferir más CO e H₂ hacia la fase líquida, y por ende volver a la presencia de un ligero exceso de CO e H₂. Si la inhibición por el producto tiene lugar como resultado de una limitación por transferencia de masa, será necesario incrementar la velocidad de alimentación de líquido para revertir la inhibición por ácido acético, por dilución a una concentración de acetato resultante más baja. Dado que un incremento en la velocidad de alimentación del medio incrementaría los µg de pantotenato o cobalto/g células producidas, esto sólo se debe hacer brevemente o será necesario eliminar el exceso de pantotenato o cobalto ajustando la concentración del medio o incrementando la velocidad de alimentación de agua. -----

3. Control de la inhibición por producto de ácido acético -----



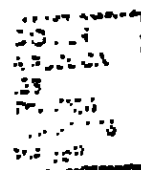
En los métodos descritos previamente, se puede producir una inhibición por producto por ácido acético si se acumula demasiado ácido acético molecular, es decir, >2 g/l, en el biorreactor como para permitir el crecimiento de las células y la producción posterior de etanol. Se utiliza otro paso de manipulación para evitar el deterioro del cultivo. Una modificación involucra un incremento breve en la velocidad de alimentación del medio acuoso o líquido para reducir la concentración en la fase líquida del ácido acético inhibidor por debajo de 2 g/l. Una ilustración de este paso para un cultivo particular en un reactor se describe en el Ejemplo 23.-----

4. Paso con reciclaje de agua-----

Aún otro paso optativo del método para mantener un cultivo estacionario capaz de producir etanol como producto único, sin una producción neta de ácido acético en los métodos de esta invención, comprende la adición de agua reciclada de la destilación al reactor de fermentación (véase, por ejemplo, el Ejemplo 15). Como se indicó previamente, el agua reciclada (que contiene hasta 5 g/l de acetato) posee la ventaja de reciclar el acetato producido nuevamente hacia el reactor de manera tal que no se produce ácido acético neto. Por consiguiente se establece un equilibrio entre el etanol y el acetato en el reactor. Como resultado de ello, todo el CO , CO_2 e H_2 alimentado al reactor y convertido en producto se utiliza en la producción de etanol, excepto lo que se utilizó para el mantenimiento del cultivo.-----

5. Reducción de la densidad de células-----

Aún otro paso de manipulación que es de utilidad en el método consiste en iniciar una purga periódica o continua de células bacterianas del biorreactor con el fin de reducir la concentración de células en dicho biorreactor. Esta

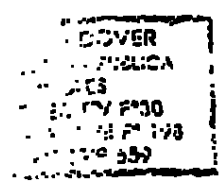


manipulación sirve para reducir la concentración de células a menos que la concentración de células del estado estacionario que usa todos los sustratos de gas reductor o nutrientes en el biorreactor. Por lo tanto, al alterar la densidad de células, se favorece la producción de etanol ante la producción de acetato en el biorreactor. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 25. _____

6. CSTR de dos etapas _____

Uno de los problemas asociados con la producción de etanol con una limitación del medio es la capacidad o tendencia del cultivo de adaptarse eventualmente a las condiciones limitantes y no continuar produciendo etanol después de varios meses de operación. En su lugar, el acetato se convierte eventualmente en el producto dominante. Esta adaptación a concentraciones bajas de nutrientes limitantes da como resultado un cultivo que produce más ácido acético que etanol (relación de producto etanol a acetato de 1,0 o menos) y bajas concentraciones de etanol (a veces tan bajas como 1 g/l). La adaptación probablemente tenga lugar cuando no se proveen nutrientes suficientes al cultivo durante el arranque, donde la velocidad de crecimiento es más importante que la velocidad de producción de etanol. Además, existe el peligro que el cultivo se pueda adaptar a las concentraciones bajas de nutrientes limitantes durante la operación de estado estacionario, en particular porque las concentraciones de nutrientes limitantes se ajustan hacia abajo para depurar el acetato del sistema de reacción. _____

Con el fin de evitar esta adaptación cuando se utilizan los pasos de pantotenato o cobalto limitantes, en lugar de permitir que el cultivo crezca con los nutrientes disponibles, y el peligro mencionado previamente, se puede emplear otra modificación del método. Un sistema de CSTR de dos etapas, en



el cual se produce un crecimiento de cultivo primariamente bueno en la primera etapa con un ligero exceso de nutrientes limitantes (tal vez con una producción conjunta de ácido acético), seguido de una etapa de producción donde el cultivo de la primera etapa será limitado por el nutriente limitante y se usa para producir concentraciones altas de etanol, constituye otra modificación del método. Esta modificación permite el mantenimiento de un cultivo estacionario, que no se adapta a concentraciones reducidas de pantotenato o cobalto. Esta modificación comprende la operación de un CSTR de dos etapas, en el cual un reactor de crecimiento (Etapa 1) alimentará a un reactor de producción (Etapa 2) donde tendrá lugar la producción del volumen más importante de etanol. El reactor de crecimiento no se opera con los pasos de limitación de nutrientes descritos previamente, de manera tal que el cultivo no sea tan susceptible a la adaptación a alguna condición limitada.

En la Figura 2 se muestra un diagrama esquemático de este sistema de CSTR de dos etapas y la siguiente descripción hace referencia a dicha figura. De acuerdo con esta realización, la etapa de crecimiento se opera con un tiempo de retención de líquidos (LRT) de aproximadamente 24 horas. El CSTR de etapa de crecimiento 1 recibe una alimentación de suficiente pantotenato o cobalto en el medio 2 como para obtener un cultivo saludable (y también puede producir un poco de ácido acético). Por consiguiente, se produce un exceso de ácido acético en el reactor, pero con una mayor estabilidad. Esta concentración de pantotenato o cobalto está en exceso con respecto a la cantidad que habitualmente se alimentaría un CSTR único utilizado para producir etanol. La alimentación de gases a este reactor es un gas no convertido 3 de la Etapa de producción 4 y la alimentación de líquido es medio fresco 2. El CSTR de etapa

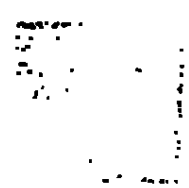


de crecimiento opera sin reciclaje de células. El propósito de este reactor con etapa de crecimiento consiste en proveer un cultivo saludable para la producción posterior de etanol, que no se adapta a concentraciones bajas de pantotenato. -----

El reactor de la etapa de producción 4 opera con un LRT nominal menor de 20 horas. Este CSTR con reciclaje de células recibe una alimentación de gases nuevo 5 y puede presentar conversiones bajas. Recibe una alimentación de medio fresco 6, así como una alimentación de cultivo 7 proveniente de la etapa de crecimiento. Se alimenta un mínimo de pantotenato o cobalto a este reactor dado que dispone del exceso de la etapa de crecimiento. El reciclaje de células 8 se usa en este reactor con el fin de obtener la mayor producción de las células enviadas de vuelta al reactor 9. La concentración de etanol de salida en el producto líquido 10 debería ser mayor que 20 g/l. Las características del sistema de CSTR de dos etapas incluyen pocos cambios para una adaptación a bajas concentraciones de pantotenato o cobalto; un LRT general menor que o igual a 30 horas; una productividad de etanol esperada mayor y una concentración más alta de etanol que en un CSTR único de las mismas dimensiones. -----

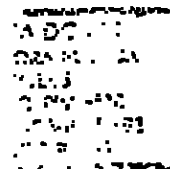
7. Modificaciones del arranque-----

Aún otros pasos del método, que se utilizan preferencialmente en la práctica de esta invención, comprenden la producción de células en el arranque inicial del cultivo de fermentación. El arranque de un biorreactor alimentado con CO, CO₂ e H₂ para producir etanol y ácido acético se lleva a cabo mediante la inoculación de una carga a partir de un cultivo madre (Ejemplo 11) o mediante el empleo de un inóculo continuo de un reactor existente como alimentación de



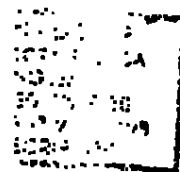
cultivo (Ejemplo 12). Como se indicó anteriormente en la descripción de la manera de evitar la adaptación de los cultivos a bajas concentraciones de pantotenato o cobalto, el cultivo se lleva convenientemente a una concentración alta de células antes de limitar los nutrientes, pero suministrando un exceso de H_2 al cultivo. Este arranque rápido ayuda en la adaptación del cultivo y permite obtener una buena relación de productos (concentraciones altas de etanol y bajas de acetato). Si no se emplea dicho arranque rápido, puede aparecer una relación pobre de productos y el cultivo puede sufrir una adaptación a concentraciones bajas de nutrientes en fase líquida y requerir la reinoculación del reactor. -----

El reactor se arranca con una carga en fase líquida (el medio líquido no se alimenta inicialmente de una forma continua al reactor), con una velocidad de agitación baja (tal vez 400-600 rpm en un reactor de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo®) y al pH deseado. La fase líquida en el reactor consiste entonces de una carga de medio de nutrientes que contiene vitaminas y sales, con una concentración nominal de nutrientes limitantes, ya sea pantotenato de calcio o cobalto (20 $\mu g/l$ pantotenato o 75 ppb de cobalto como ejemplo). Si se emplea inoculación continua de un reactor existente, probablemente no sea necesaria una operación de una carga en fase líquida. En este caso, se alimenta gas de forma continua al reactor durante el arranque inicial a velocidad baja. Idealmente, la fase gaseosa en el momento del arranque estaría libre de CO_2 , abundante en H_2 y la velocidad del gas y la velocidad de agitación se mantendrían a niveles bajos con el fin de evitar una inhibición por sustrato por CO . -----



Un ejemplo de protocolo de arranque general para producir y sustentar concentraciones de etanol comercialmente viable a partir de CO , CO_2 e H_2 consiste de tres fases distintivas: (a) arranque inicial, donde la producción de células es crítica; (b) arranque en el cual la velocidad de producción se vuelve crítica; y (c) operación de estado estacionario. Esencialmente, el arranque inicial se caracteriza por la inoculación de una carga líquida, con nutrientes limitantes nominales, seleccionados entre cobalto (75 ppb) o pantotenato de calcio (20 $\mu\text{g/l}$) a un valor de pH deseado (típicamente 4,5-5,5). Para facilitar el arranque, se prefiere mantener la velocidad de alimentación de gases y la velocidad de agitación en valores bajos, en tanto se alimenta un exceso de H_2 . La causa de la producción de etanol durante el arranque es el exceso H_2 ; la limitación de nutrientes ocurre más adelante. Por consiguiente, hay en realidad un exceso de nutrientes líquidos durante el arranque con el fin de evitar una adaptación involuntaria del cultivo a pocos nutrientes. A medida que la fermentación avanza sobre un período de varias horas después de la inoculación, se produce CO_2 y se consume H_2 . Los cambios en estas velocidades indicaron que la velocidad de agitación debería incrementarse lentamente de forma nominal (tal vez en 200-300 rpm en un reactor de laboratorio, sobre un período de 2-3 días) con el fin de evitar una limitación por transferencia de masa. -----

Este inicio de producción de CO_2 se produce más rápidamente en los sistemas que emplean inoculación continua en oposición a una inoculación por lotes a partir de un cultivo madre. Sin embargo, si se aumenta demasiado la velocidad de agitación, se produce inhibición por sustrato de CO . Este procedimiento de observación de la conversión de H_2 (o producción de CO_2)



aumentando nominalmente la velocidad de agitación se produce a una velocidad relativamente rápida hasta alcanzar la velocidad de agitación de interés. Durante este tiempo de incremento de la velocidad de agitación en el cultivo líquido, la producción de células en lugar de formación de producto es de gran importancia. -----

Una vez alcanzada la velocidad de agitación de interés (800-1000 rpm en un reactor de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo®), se permite que el cultivo se estabilice para confirmar la captación de H_2 . El arranque cambia a una modalidad en la cual la velocidad de producción se vuelve importante. Resulta conveniente contar con conversiones de CO que excedan un 80% y una presión parcial de H_2 alta en el gas de salida (por lo menos 0,55 atm) con el fin de asegurar la producción de etanol en tanto limitar la concentración del acetato y de ácido acético molecular libre. Luego se aumenta la velocidad de la alimentación de medio líquido (para los sistemas que cuentan con una inoculación por lotes a partir de un cultivo madre) para iniciar la alimentación continua de líquido y se aumenta la velocidad del gas en incrementos del 10% hasta alcanzar la velocidad de flujo deseada. El H_2 permanece en exceso para evitar la producción de un exceso de ácido acético. A medida que aumenta la velocidad, se limitan los nutrientes en fase líquida (pantotenato de calcio o cobalto) y el efecto de dicha limitación es una pequeña caída en la conversión de H_2 en la producción de interés. -----

En la operación de estado estacionario, se alcanza una producción de 15-35 g/l de etanol y 0-5 g/l de acetato. En esta etapa, es necesario efectuar pequeños ajustes en los nutrientes limitantes, en las velocidades de alimentación líquida y en la velocidad de alimentación de gases y serán



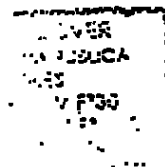
elegidos por el especialista por sus conocimientos en el arte así como por las descripciones de esta invención. Si al método de producción de etanol se agregará reciclaje de células, en este momento se dispondrá un ajuste en la velocidad del gas (incremento) y en la concentración de nutrientes (disminución).-----

Los métodos descriptos previamente para producir y mantener de forma continua las concentraciones altas de etanol con bajas concentraciones del subproducto acetato, bajo condiciones de funcionamiento estacionarias, mejoran el uso de las bacterias de la invención a escala comercial para la producción de etanol. Los pasos descriptos en los métodos anteriores superan las limitaciones en el uso de las bacterias de la invención para una producción comercial de etanol a partir de CO , CO_2 e H_2 . El método emplea preferentemente un biorreactor continuo, si bien también es posible utilizar métodos de fermentación por lotes y de alimentación por lotes, aunque no es probable que sean económicamente viables para una producción a gran escala de etanol.-----

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos, métodos y pasos de métodos acordes con esta invención. Estos ejemplos no limitan la invención, cuyo alcance está comprendido en las reivindicaciones adjuntas.-----

EJEMPLO 1. EJEMPLO DEL MÉTODO DE LA PRESENTE INVENCION-----

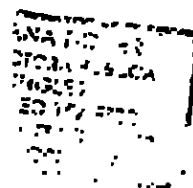
Se introduce de forma continua un gas de síntesis o residual, que contiene CO y/o CO_2/H_2 , en un tanque agitado de un biorreactor que contiene una cepa de *C. ljungdahlii*, junto con un medio líquido convencional que contiene vitaminas, trazas de metales y sales. Un medio de nutrientes deseado se describe más adelante en la Tabla 1.-----



Durante el arranque del método con un inóculo de cultivo de 10% o menos, el reactor se opera con una carga en fase líquida, donde el medio líquido no se alimenta de forma continua al reactor. La fase líquida en el reactor consiste entonces de una carga de medio de nutrientes con una concentración nominal de nutrientes limitantes, ya sea pantotenato de calcio o cobalto. Como alternativa, también se puede emplear un medio rico que contiene extracto de levadura, tripticasa u otros nutrientes complejos.-----

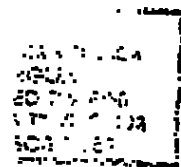
Idealmente, la fase gaseosa del arranque está libre de CO_2 y contiene un exceso de H_2 . La velocidad del gas y la velocidad de agitación se mantienen a niveles bajos (menos que 500 rpm en un biorreactor de fermentación New Brunswick Scientific Bioflo®) para obtener un ligero exceso de CO e H_2 , pero evitando al mismo tiempo una inhibición por sustrato de CO . En un biorreactor de fermentación de laboratorio de un litro New Brunswick Scientific Bioflo®, como ejemplo, donde la composición de la alimentación gaseosa es de 63% de H_2 , 32% de CO y 5% de CH_4 , la velocidad de agitación para iniciar el arranque es de 400 rpm y la velocidad del gas es de 20 ml/min. la causa de la producción de etanol durante el arranque es el exceso de H_2 ; la limitación por nutrientes se produce más adelante. Por consiguiente, existe en realidad un exceso de nutrientes líquidos (pantotenato, cobalto) durante el arranque para evitar una adaptación involuntaria del cultivo a bajos contenidos de nutrientes.--

A medida que la fermentación avanza sobre un periodo de varias horas después de la inoculación, se produce CO_2 por la conversión de CO y se consume H_2 junto con el CO_2 , que es una señal para incrementar nominalmente la velocidad de agitación con el fin de evitar una limitación por transferencia de masa gaseosa. En el CSTR New Brunswick Scientific Bioflo®,



el gas de salida es 25% de CO, 67% de H₂, 2% de CO₂ y 6% de CH₄. Si la velocidad de agitación se aumenta demasiado rápido, se produce inhibición por sustrato de CO, como lo evidencia una disminución en la concentración de metano después de aumentar la agitación. Así, la velocidad de agitación se puede incrementar típicamente en 200 rpm sobre 24 horas. Este procedimiento de monitoreo de la producción de CO₂ (o conversión de H₂) al tiempo que se incrementa nominalmente la velocidad de agitación se produce a una velocidad relativamente rápida hasta alcanzar la velocidad de agitación de interés. Una velocidad de agitación de interés típica en el biorreactor de fermentación New Brunswick Scientific Bioflo® es de 900 rpm. Durante este periodo de incremento de la velocidad de agitación en la carga de cultivo líquido, la producción de células en lugar de formación de producto es de gran importancia. De esta manera, se obtienen concentraciones de células de aproximadamente 1,5 g/l, en tanto las concentraciones típicas de producto son de 10 g/l de etanol y 2 g/l de acetato a partir de la carga del cultivo. -----

Una vez alcanzada la velocidad de agitación, se deja que el sistema crezca hasta alcanzar una captación máxima de H₂. Resulta conveniente contar con concentraciones de salida de H₂ muy altas (típicamente > 60%) con el fin de asegurar la producción de etanol y limitar al mismo tiempo la producción de ácido acético. Luego se cambia la alimentación de medio líquido (para los sistemas que cuentan con inoculación de carga a partir de un cultivo madre) para iniciar una alimentación de líquido continua y la velocidad de alimentación de gases se incrementa hasta alcanzar la velocidad de flujo de interés. En el biorreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® la velocidad de alimentación líquida es típicamente de 0,5 ml/min, en tanto la



velocidad del flujo gaseoso se incrementa en un 10 a 15% cada 24 horas hasta alcanzar la velocidad de interés de 125 ml/min.-----

Es importante proveer un exceso de H_2 en la alimentación gaseosa para evitar la producción de un exceso de ácido acético. A medida que aumenta la velocidad del flujo gaseoso, la producción de células aumenta hasta que se produzca una eventual limitación de nutrientes en fase líquida en el reactor (pantotenato de calcio o cobalto), evidenciada por una pequeña caída en la conversión de H_2 a la productividad de interés. En el CSTR New Brunswick Scientific Bioflo®, esto se reconoce por una caída del 10% en la conversión de H_2 a la productividad de interés de 20 g/l·día.-----

El método de producción y el sistema de reactor se mantienen entonces en un estado estacionario con una producción de 15 a 35 g/l de etanol y 0 a 5 g/l de acetato como productos, con pequeños ajustes ocasionales en los nutrientes limitantes, la velocidad del líquidos y la velocidad del gas. Las condiciones típicas de estado estacionario en el biorreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® sin células recicladas, son un tiempo de retención gaseoso (velocidad del flujo gaseoso/volumen de líquido del reactor) de 20 minutos, un tiempo de retención de líquidos (velocidad del flujo líquido/volumen de líquido del reactor) de 30 horas y una velocidad de agitación de 900 rpm, con lo cual se obtiene una conversión de CO del 92% y una conversión de H_2 del 60% con limitación por pantotenato.-----

En una realización de este método en el cual se agregan células recicladas al sistema del reactor, dicha adición tiene lugar en este momento junto con un ajuste en la velocidad del gas (incremento) y la concentración de nutrientes (disminución). Con células recicladas en el CSTR New Brunswick

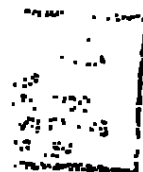


Scientific Bioflo®, el tiempo de retención gaseoso es típicamente de 8 minutos, el tiempo de retención de líquidos es de 12 horas, el tiempo de retención de células es de 40 horas y la velocidad de agitación es de 900 rpm. Estas condiciones permiten obtener típicamente una conversión de CO del 92% y una conversión de H₂ del 50% con limitación por pantotenato.-----

EJEMPLO 2. ANÁLISIS DE MUESTRAS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Con el fin de obtener y/o mantener una apropiada productividad y relación, es necesario obtener muestras periódicas del caldo de fermentación en el biorreactor de fermentación. Se toman muestras mayores que 1,5 ml de cultivo del cultivo en el biorreactor. La muestra se coloca en un tubo para microcentrifuga y el tubo se coloca en una centrífuga Fisher Scientific Micro 14 con el contrapeso necesario para el equilibrio. La muestra es sometida a 8000 rpm durante 1,5 minutos. Se coloca una muestra del sobrenadante de 0,500 ml en un vial de 1,5 ml diseñado para su uso en un cromatógrafo gaseoso con dispensador automático. Se utiliza una muestra de 0,500 ml como solución de estándar interno que contiene n-propanol 5 g/l y 5% v/v, ácido fosfórico 85% en agua desionizada. El ácido fosfórico asegura que todo el acetato sea convertido en ácido acético y se detecta por cromatografía gaseosa.-----

Luego se inyecta un μ l de la muestra preparada con el dispensador automático en un Cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890 Serie II equipado con una columna capilar de sílice fundido de 25 m x 0,53 mm de DI 007 FFA Quadrex. El análisis se efectúa con un gas transportador de helio en la modalidad de flujo partido con un flujo partido de 66 ml/min y 7,93 ml/min de purga del inyector. La presión en la cabeza de la columna se definió en 4 psig que permite obtener un flujo transportador por la columna de 7 ml/min. El



programa de temperatura es de 75 °C durante 0,2 minutos, un rampa hasta 190 °C a una velocidad de 30 °C/minuto y un tiempo de retención a 190 °C durante 5,17 minutos. El tiempo de corrida resultante es de 8 minutos. El instrumento se calibró para etanol (0-25 g/l), ácido acético (0-25 g/l), n-butanol (0-5 g/l) y ácido butírico (0-5 g/l). Se utilizaron cinco estándares, preparados a partir de materiales de grado reactivo, para la calibración. Si la muestra se encuentra fuera del rango de concentración de calibración (por ejemplo, >25 g/l, etanol), se colocan 0,250 ml de la muestra y 0,250 ml de agua desionizada en el vial con 0,500 ml de estándar interno y se incluye el factor de dilución en el análisis.

EJEMPLO 3: PRODUCCIÓN DE ÁCIDO EN UN CSTR DE LABORATORIO CON CÉLULAS RECICLADAS

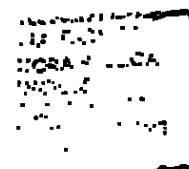
Se operó un bioreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® con células recicladas usando *Clostridium ljungdahlii*, cepa ER12, ATCC 55350 para la producción de ácido acético a partir de CO, CO₂ e H₂. La alimentación gaseosa contenía 40% de H₂, 50% de CO y 10% de N₂ y el tiempo de retención gaseoso en el reactor de un litro era de 7,7 a 8,6 minutos. El medio líquido, que contenía vitaminas, sales y trazas de elementos, se alimentó con un tiempo de retención de líquidos de 2,6 a 2,9 horas. El pH fue de 5,1 a 5,2, la velocidad de agitación era de 1000 rpm y el tiempo de retención de células era de aproximadamente 40 horas. Bajo estas condiciones de limitación por transferencia de masa (y no de limitación por nutrientes), la conversión de CO era del 94 al 98% y la conversión de H₂ era del 80 al 97%. La concentración de células era de 4 a 8 g/l y el acetato de 10 a 13 g/l. No se produjo etanol. Si bien el reactor se operó bajo limitación por transferencia de masa (limitado por la capacidad de transferir gases al cultivo) y por



consiguiente solamente producía ácido acético como producto, se monitorearon los parámetros para la producción de etanol mediante limitación por pantotenato, limitación por cobalto o la presencia de un exceso de H_2 o CO para servir como comparación cuando se produce etanol como producto dominante.

Tal como se muestra en la Tabla 2, la alimentación de pantotenato de Ca por unidad de células producidas fue de 1575 a 3150 microgramos por gramo de células producidas ($\mu g/g$ células producidas). De manera similar, la alimentación de cobalto por gramo de células producidas fue de 1734 a 3468 ($\mu g/g$ células producidas). La velocidad de captación de CO específica fue de 0,35 a 0,61 mmol/g células/minuto. La relación de los moles de H_2 alimentados con respecto a la suma de dos veces los moles de CO convertido y tres veces los moles de CO_2 convertido fue menor que 0,46. Por consiguiente, ninguno de los parámetros se encontraba en el rango de operación deseado para la producción de etanol por el cultivo.

Se debe tener en cuenta que se alimentó un gran exceso de pantotenato y el cobalto al reactor anterior al elaborar ácido acético como producto bajo limitación por transferencia de masa. Es decir, se podían disminuir significativamente los niveles de pantotenato y/o cobalto y aún estar por encima de los niveles para una limitación por pantotenato o cobalto. Para ilustrar esto, se modificó el medio alimentado al biorreactor de fermentación de 1 litro New Brunswick Scientific Bioflo® para disminuir significativamente la adición de cobalto hasta un nivel que se encontraba justo por encima de la concentración de cobalto para una limitación por cobalto. Nuevamente el reactor contenía *C. ljungdahlii*, cepa ERI2 para la producción de ácido acético a partir de CO , CO_2

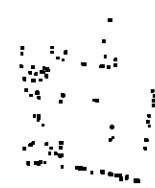


e H_2 . La alimentación gaseosa contenía 55% de H_2 , 25% de CO, 15% de CO_2 y 5% de CH_4 . (gas de referencia) y el tiempo de retención gaseoso fue de 7,5 a 8,0 minutos. El medio líquido que contenía sales, vitaminas y trazas de elementos se alimentó con un tiempo de retención de líquidos de 3,0 a 3,5 horas y el tiempo de retención de células fue de 40 horas. El valor del pH era de 5,0 a 5,3 y la velocidad de agitación era de 900 a 1000 rpm. Bajo estas condiciones la conversión de CO era del 95 al 99% y la conversión de H_2 era del 94 al 98%. La concentración de células era de 2,5 a 4,0 g/l y de acetato era el único producto a 10 a 14 g/l. —————

La alimentación al reactor de pantotenato de Ca por gramo de células fue de 2250 a 3600 μg de pantotenato/g células producidas. La alimentación de cobalto por unidad de células producidas se redujo hasta un rango de 62,0 a 99,2 μg de cobalto/g células producidas. La velocidad de captación específica de CO era de 0,325 a 0,4 mmol/g células/minuto. La relación de H_2 alimentado con respecto a la suma de dos veces de CO convertido y tres veces de CO_2 convertido era de 0,875.

EJEMPLO 4. PRODUCCIÓN DE ETANOL EN CSTR DE LABORATORIO CON LIMITACIÓN POR PANTOTENATO —————

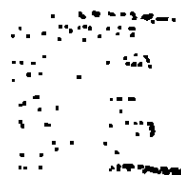
Se operó un biorreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® II como un CSTR recto (sin células recicladas) usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, ATCC 55988, para la producción de etanol a partir de CO, CO_2 e H_2 , limitado en pantotenato. La alimentación de gases al reactor contenía 63,3% de H_2 , 31,4% de CO y 5,3% C_2H_6 (gas de referencia); alimentado con un tiempo de retención gaseoso de 27 minutos. El medio líquido que contenía exceso de sales y trazas de elementos y un suministro



limitado de pantotenato se alimentó al reactor de 1,55 litros con un tiempo de retención de líquidos de 31,4 horas. El valor del pH era de 4,6 a 4,7 y la velocidad de agitación era de 650 rpm. Bajo estas condiciones de funcionamiento la conversión de CO era del 98%, la conversión de H₂ era del 83% y la concentración de células era de 1,5 a 2,0 g/l. Se produjo etanol a una concentración de 15 a 19 g/l y de acetato a 1,5 g/l. La productividad de etanol varió en un rango de 11,5 a 14,5 g/l·día.-----

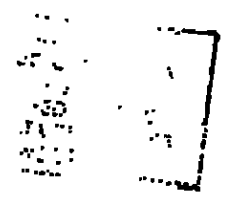
Al analizar los parámetros para la producción de etanol, se observó limitación por pantotenato cuando se operaba con una relación de alimentación de pantotenato a producción de células de 17,7 a 23,6 µg de pantotenato/g de células producidas. Compárese esta relación con los 2250 a 3600 µg de pantotenato/g de células producidas y los 1575-3150 µg de pantotenato/g de células producidas en el Ejemplo 3 para la producción de ácido. La alimentación de cobalto por unidad de células producidas fue de 5000 a 6000 µg de cobalto/g de células producidas, un nivel que es aún mayor que en el Ejemplo 3 y asegura que no hay limitación por cobalto. La velocidad de captación específica de CO fue de 0,23 a 0,30 mmol/g de células/minuto. La relación de H₂ alimentado con respecto a la suma de dos veces el CO convertido y tres veces el CO₂ convertido fue de 1,03 y la presión parcial de H₂ en el gas de salida era de 0,55-0,64 atm. Es posible que el exceso de H₂ o la limitación por pantotenato causó la producción de etanol.-----

También se estudió la limitación por pantotenato para la producción de etanol en otro reactor de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® II operado con células recicladas usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, ATCC 55988. Este reactor recibió una alimentación de gases que contenía 61,7% de H₂.



30,6% de CO y 5,2% C₂H₆ (gas de referencia) con un tiempo de retención gaseoso de 12,3 minutos. El medio líquido que contenía un suministro limitado de pantotenato junto con un exceso de sales y trazas de elementos se alimentó al reactor de 2,4 litros con un tiempo de retención de líquidos de 24,8 horas. Las células recicladas se proporcionaron empleando una membrana de fibras huecas de 0,2 µm y el tiempo de retención de células fue de 69 horas. El valor del pH era de 4,6 y la velocidad de agitación fue de 650 rpm. Bajo estas condiciones, la conversión de CO era del 90%, la conversión de H₂ era del 53% y la concentración de células era de 2,5 g/l. la concentración de etanol era de 18 g/l y la concentración de acetato era de 3 g/l. La productividad de etanol era de 17,4 g/l·día.-----

Al analizar los parámetros para la producción de etanol (Tabla 2), la relación de pantotenato alimentado por unidad de células producidas era de 8,08 µg de pantotenato/g de células producidas. Nuevamente, se aseguró la limitación por pantotenato al operar a un nivel mucho menor que la requerida para la producción de acetato. El cobalto alimentado por unidad de células producidas era de 3960 µg de cobalto/g de células producidas. La velocidad de captación específica de CO era de 0,33 mmol/g de células·minuto. La relación de H₂ alimentado con respecto a la suma de dos veces el CO convertido y tres veces el CO₂ convertido era de 1,14 y la presión parcial de H₂ en el gas de salida era de 0,60-0,65 atm. El exceso de H₂ podría ser un motivo potencial para la producción de etanol; sin embargo, el gran contenido de CO₂ en el gas de salida (0,14 atm) muestra que el crecimiento estaba limitado por pantotenato.-----



En otro experimento, el cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa ERI12, recibió 1500 a 3600 µg de pantotenato/g de células producidas durante la producción de ácido acético a partir de CO, CO₂ e H₂, una condición en la cual no se limitaba el contenido de pantotenato en el reactor (o cualquier otra limitación excepto la capacidad de transferencia de gases al cultivo), y no se encontró etanol en el flujo de producto. _____

Durante la limitación por pantotenato para la producción de etanol a partir de CO, CO₂ e H₂, el cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, recibió 8 a 24 µg de pantotenato/g de células producidas, manteniendo al mismo tiempo el exceso de los demás nutrientes. Bajo estas condiciones, la cepa C-01 produjo 15 a 19 g/l de etanol y 1,5 a 3,0 g/l de acetato _____

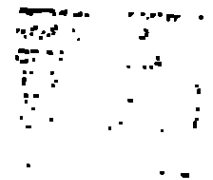
EJEMPLO 5. PRODUCCIÓN DE ETANOL EN CSTR DE LABORATORIO CON LIMITACIÓN POR COBALTO _____

Se operó un biorreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® II como un CSTR recto (sin células recicladas) usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, ATCC 55988, para la producción de etanol a partir de CO, CO₂ e H₂ con limitación por cobalto. El gas alimentado al reactor contenía 60% de H₂, 35% de CO y 5% de CH₄ (gas de referencia) y se alimentó con un tiempo de retención gaseoso de 14 minutos. El medio líquido que contenía un exceso de sales, vitaminas y trazas de metales (excepto por el cobalto, que era limitante) se alimentó en el reactor de 2,5 l con un tiempo de retención de líquidos de 40 horas. El valor del pH era de 4,9 y la velocidad de agitación era de 650 rpm. Bajo estas condiciones, la conversión de CO era del 91%, en tanto la conversión de H₂ varió de 20 a 80%, pero nominalmente era del 55%. Se produjo etanol a una concentración de 26 g/l, acetato a una concentración de 4

g/l y la concentración de células fue de 2,5 g/l. La productividad de etanol era de 15,6 g/l-día.

Al analizar los parámetros para la producción de etanol, la relación de pantotenato alimentado para la producción de células era de 15,2 µg de pantotenato/g de células producidas. Este nivel era bastante bajo, de manera tal que no aseguraba la limitación por cobalto ante una limitación por pantotenato. La limitación por cobalto se observó al operar con 33,3 µg de cobalto/g de células producidas, un nivel que es 100 veces menor que el utilizado en los reactores sin limitación por cobalto. La relación de H₂ alimentado con respecto a la suma de dos veces el CO convertido y tres veces el CO₂ convertido era de 0,94. La velocidad de captación específica de CO era de 0,37 mmol/g de células/minuto.

La limitación por cobalto para la producción de etanol también se demostró en un CSTR con células recicladas usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, ATCC 55988. Este experimento se realizó para demostrar la limitación por cobalto en presencia de un exceso de pantotenato, todo lo contrario al reactor anterior en este ejemplo. En un biorreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® 2000 con una membrana de fibras huecas de 0,2 µm para las células recicladas, se introdujo gas que contenía 60% de H₂, 35% de CO y 5% de CH₄ (gas de referencia) con un tiempo de retención gaseoso de 5 minutos. El medio líquido que contenía un exceso de sales, vitaminas y metales traza (nuevamente, excepto cobalto que es limitante) se introdujo en el reactor de 1,2 litros con un tiempo de retención de líquidos de 16 horas. El valor del pH era de 5,1 y la velocidad de agitación era de 825 rpm. El tiempo de retención de células en este CSTR con fibras huecas para las células

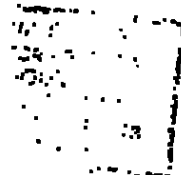


recicladitas era de 40 horas. Bajo estas condiciones, la conversión de CO era del 83%, la conversión de H₂ era del 50% y la concentración de células era de 4,2 g/l. La concentración de etanol era de 18 g/l y la concentración de acetato era de 4 g/l. La productividad de etanol era de 27 g/l·día. -----

Al hacer referencia a los parámetros para la producción de etanol en este reactor (Tabla 2), la relación de pantotenato alimentado a la producción de células era de 85,7 µg de pantotenato/g de células producidas, un nivel que es 5,5 veces mayor que en el reactor anterior en este ejemplo. La limitación por cobalto se observó en la operación con 47,6 µg de cobalto/g de células producidas. La relación de H₂ alimentado con respecto a la suma de dos veces el CO convertido y tres veces el CO₂ convertido era de 1,03 y la presión parcial de H₂ en el gas de salida era de 0,60 atm. Nuevamente, el exceso de H₂ podría ser un motivo potencial de la producción de etanol; sin embargo, el alto contenido de CO₂ en el gas de salida (0,1-0,15 atm) muestra que el crecimiento era limitado por cobalto. La captación específica de CO era 0,50 mmol/g de células·minuto. -----

EJEMPLO 6. PRODUCCIÓN DE ETANOL EN CSTR DE LABORATORIO CUANDO SE OPERA CON UN EXCESO DE CO-----

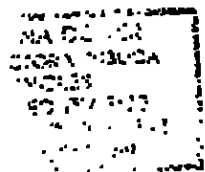
Se operó un reactor de alta presión AUTOKLAVTM (Buchi) como un CSTR con circulación de cultivo y células recicladas usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, para la producción de etanol a partir de CO, CO₂ e H₂ en presencia de exceso de CO por un período de 50 horas. El reactor se operó a 25 psig y se alimentó con gas que contenía 57% de H₂, 36% de CO y 6% de C₂H₆. El tiempo de retención gaseoso era variable, pero nominalmente era de 3,0 minutos. El medio líquido, que contenía un exceso de sales, vitaminas



(incluyendo pantotenato) y metales traza, se introdujo en un reactor de 600 ml con un tiempo de retención de líquidos de 8,2 horas. El tiempo de retención de células, obtenido haciendo pasar el efluente del a través de un filtro de fibras huecas de cerámica, era de 18,5 horas. El valor del pH era de 4,5, la velocidad de agitación era de 450 rpm y la velocidad de recirculación de líquidos era de 0,4 a 0,5 gpm. Bajo estas condiciones, las conversiones de gas eran variables, pero la conversión de CO era nominalmente del 72% y la conversión de H₂ era nominalmente del 12%. La concentración de células era de 2,7 g/l. Se produjo etanol a una concentración de 9,9 g/l y acetato a una concentración de 2,6 g/l. La productividad de etanol era de 29,0 g/l·día. —————

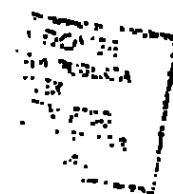
Al analizar los parámetros para la producción de etanol, la relación de pantotenato alimentado a la producción de células era de 97 µg de pantotenato/g de células producidas. Este nivel es suficientemente alto como para asegurar que el pantotenato no era limitante. La relación de cobalto alimentado a la producción de células era de 836 µg de cobalto/g de células producidas, nuevamente un nivel que aseguraba que el cobalto no era limitante. La relación de H₂ alimentado con respecto a la suma de dos veces el CO convertido y tres veces el CO₂ convertido era de 1,09 y la presión parcial de H₂ era de 1,6 atm. El alto contenido de CO₂ en el gas de salida (0,5 atm) asegura que el exceso de H₂ no causó la producción de etanol. La velocidad de captación específica de CO era de 1,34 mmol/g de células/min, un nivel que asegura que el exceso de CO como método de producción de etanol. —————

La técnica de utilizar un exceso de CO para la producción de etanol también se demostró en otro experimento con *C. ljungdahlii*, cepa C-01, en el sistema (Buchi) de reactor AUTOKLAVTM, nuevamente con células recicladas y



con circulación de cultivo, por un periodo de 24 horas. En este experimento, en el reactor de 600 ml se introdujo gas, que contenía 15,8% de H_2 , 36,5% de CO_2 , 38,4% de N_2 y 9,3% de CO_2 con un tiempo de retención gaseoso de 1,4 minutos. La presión en el reactor se mantuvo en 40 psig. El medio líquido, que contenía un exceso de sales, vitaminas y metales traza, se alimentó con un tiempo de retención de líquidos de 4,8 horas y el tiempo de retención de células, obtenido haciendo pasar el efluente a través de un filtro de fibras huecas de cerámica, era de 19,2 horas. El valor del pH era de 4,5, la velocidad de agitación era de 1000 rpm y la velocidad de recirculación de líquidos era de 0,4 a 0,5 gpm. Bajo estas condiciones, la conversión de CO era del 71,6% y la conversión de H_2 era del 11,8%. La concentración de células era de 7,1 g/l, se produjo el etanol a una concentración de 12,0 g/l y se produjo acetato a una concentración de 2,7 g/l. La productividad de etanol era de 60 g/l·día. -----

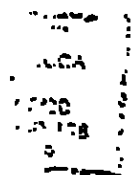
Al analizar los parámetros para la producción de etanol (Tabla 2), la relación de pantotenato alimentado a la producción de células era de 294 μ g de pantotenato/g de células producidas. Este nivel constituye un gran exceso con respecto al nivel mínimo requerido para provocar la producción de etanol debida a una limitación por pantotenato. La velocidad de alimentación de cobalto a la producción de células era de 735 μ g de cobalto/g de células producidas, nuevamente un nivel que asegura que se utilizaba un exceso de cobalto. La relación de H_2 alimentado con respecto a la suma de dos veces el CO convertido y tres veces el CO_2 convertido era de 0,3. La velocidad de captación de CO era de 0,67 mmol/g de células/min, un nivel que, nuevamente, asegura que un exceso de CO se encuentra disponible como método para producir etanol. -----



EJEMPLO 7. PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE UN EXCESO DE H₂

Se operó un biorreactor de fermentación de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo como un CSTR recto (sin células recicladas) usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, ATCC 55988, para la producción de etanol a partir de CO, CO₂ e H₂ en la presencia de un exceso de H₂. La alimentación de gases al reactor contenía 77% de H₂, 19% de CO y 4% de CH₄ (gas de referencia), alimentado con un tiempo de retención gaseoso de 30 minutos. El medio líquido que contenía un exceso de sales, vitaminas y elementos traza se alimentó al reactor con un tiempo de retención de líquidos de 36 horas. El valor del pH era de 5,0 y la velocidad de agitación era de 1000 rpm. Bajo estas condiciones de funcionamiento, la conversión de CO era del 97-99% y la conversión de H₂ era del 60-80%. La concentración de células era de 0,8-1,0 g/l, la concentración de etanol era de 10 g/l y la concentración de acetato era de 3,3 g/l. La productividad de etanol era de 6,7 g/l-día.

Al analizar los parámetros para la producción de etanol, la relación de pantotenato alimentado a la producción de células era de 900-1125 µg de pantotenato/g de células producidas, lo cual aseguraba la presencia de un exceso de pantotenato. De manera similar, la relación de cobalto alimentado a la producción de células era de 991-1239 µg de cobalto/g de células producidas, lo cual nuevamente aseguraba la presencia de un exceso de cobalto. La velocidad de captación específica de CO era de 0,28-0,35 mmol/g de células/min, un nivel tal que el exceso de CO no permitía la producción de etanol. La relación de los moles de H₂ alimentado con respecto a la suma de 2 veces los moles de CO convertido y tres veces los moles de CO₂ convertido era



de 1,96, una relación superior a 1,0, el nivel donde ya hay exceso de H_2 y por consiguiente podría controlar la producción de etanol. La presión parcial de H_2 en el gas de salida era de 0,70-0,87 atm y la relación de la presión parcial de H_2 con la presión parcial de CO_2 en el gas de salida era de 65. Por consiguiente, el reactor estaba produciendo etanol debido a la presencia de un exceso de H_2 . _____

En un segundo experimento, se operó un reactor (Buchi) de alta presión AUTOKLAVTM como un CSTR con circulación de cultivo y células recicladas usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, para la producción de etanol a partir de CO, CO_2 e H_2 en presencia de un exceso de H_2 . La alimentación de gases al reactor contenía 81% de H_2 , 16% de CO y 3% de CH_4 (gas de referencia), alimentado con un tiempo de retención gaseoso de 2,21 minutos. El medio líquido que contenía un exceso de sales, vitaminas y elementos traza se alimentó al reactor con un tiempo de retención de líquidos de 8,97 horas. El tiempo de retención de células era de 22,7 horas, el valor del pH era de 4,5 y la velocidad de agitación era de 800 rpm. Bajo estas condiciones de funcionamiento, la conversión de CO era del 91,5% y la conversión de H_2 era del 43,4%. La concentración de células era de 5,5 g/l y la concentración de acetato era de 2,85 g/l. La productividad de etanol en el reactor era de 215-240 g/l·día. _____

Al analizar los parámetros para la producción de etanol, la alimentación de pantotenato con respecto a la relación de producción de células era de 46 μ g de pantotenato/g de células producidas, un nivel que puede ser indicativo de limitación por pantotenato. La alimentación de cobalto con respecto a la relación de producción de células era de 460 μ g de cobalto/g de células producidas, un nivel que permite asegurar que el cobalto no era limitante. La

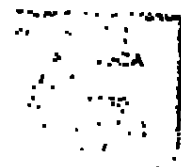


velocidad de captación específica de CO era de 1,68 mmol/g de células/min, un nivel que podría ser indicativo de la presencia de un exceso de CO si no fuera por la alta velocidad de captación de H₂ de 4,14 mmol/g de células/min, que indicaba que no había inhibición por sustrato por la conversión de H₂. La relación de moles de H₂ alimentado con respecto a la suma de dos veces los moles de CO convertido y tres veces los moles de CO₂ convertido era de 5,67, un valor que era muy superior a la relación requerida de 1,0 para un exceso de H₂. La presión parcial de H₂ en el gas de salida era de 2,61 atm y la relación de presión parcial de H₂ a presión parcial de CO₂ en el gas de salida era de 10,9. Por consiguiente, se estaba produciendo etanol en el reactor como resultado de la presencia de un exceso de H₂. -----

En la Tabla 2, más adelante, se muestra un resumen comparativo de los parámetros del método y los resultados para los Ejemplos 3 a 7. -----

EJEMPLO 8. CAMBIO EN LA PRODUCCIÓN DE LAS CEPAS ERI2, C-01 Y PETC DE *C. LJUNGDAHLII* CON EL USO DE FORMULACIONES DE MEDIOS -----

Los métodos de esta invención se pueden aplicar a cualquiera de las cepas de *C. ljungdahlii*. Los resultados de los experimentos de manipulación del medio con las cepas ERI2, C-01 y PETC se muestran más adelante en la Tabla 3. El propósito de estos experimentos era demostrar que cada una de las cepas puede cambiar la producción de ácido acético a la producción de etanol meramente por manipulación del medio. Por consiguiente, se alimentó un cultivo con un exceso de nutrientes (incluyendo pantotenato y cobalto) con el fin de producir ácido acético como producto dominante y luego se limitó en cuanto a pantotenato o cobalto para producir etanol como producto dominante.



Cabe destacar que el único propósito de estos experimentos era demostrar que la manipulación del medio puede dar como resultado un cambio del producto para cada una de las cepas. Por lo tanto, la obtención de altas concentraciones de producto y productividades altas no era el objetivo de estos experimentos. —

El reactor se operó como un CSTR recto (sin células recicladas) en cada uno de los experimentos de cultivos. El tiempo de retención gaseoso se definió nominalmente en 50 minutos, el tiempo de retención de líquidos se definió nominalmente en 40 horas y la velocidad de agitación se definió nominalmente en 1000 rpm. Estas condiciones se eligieron para poder efectuar comparaciones con las cepas, pero no para obtener altas productividades. —

Tal como se indica en la Tabla 3, la cepa ERI2 fue sometida a cinco cambios de medio que permitían alternar la obtención de productos entre ácido acético como producto dominante y etanol como producto dominante. Tanto la limitación por pantotenato como la limitación por cobalto se demostraron para la producción de etanol por esta cepa. La cepa C-01 se alternó tres veces usando manipulación del medio, nuevamente se demostró la limitación por pantotenato y la limitación por cobalto como mecanismo para la producción de etanol. La cepa PETC solamente se alternó una vez, con producción de etanol debido a limitación por cobalto. Cada una de las cepas mostraron mayores conversiones de H_2 cuando producían ácido acético, en lugar de etanol, como producto dominante. Esto tiene lugar porque el ácido acético se produce con limitación por transferencia de masa (limita la cantidad de gas que pasa al cultivo), en tanto el etanol se produce cuando se limitan los nutrientes, y por ende el exceso de gas suministrado puede afectar negativamente la conversión de gases. Siempre hay pequeñas cantidades de acetato en el flujo de producto



cuando el producto dominante es etanol. Sin embargo, cuando el ácido acético es el producto dominante, habitualmente no hay etanol en concentraciones mensurables. Al cambiar los productos dominantes de etanol a ácido acético por manipulación de nutrientes, se demostró que era muy difícil eliminar toda traza de etanol. Solamente se observaba que la eliminación completa de etanol tenía lugar después de varias semanas de operación continua con un medio prevaleciente para ácido acético. -----

EJEMPLO 9. OPERACIÓN EN ESTADO ESTACIONARIO CON Y SIN CÉLULAS RECICLADAS -----

La meta comercial final de producir etanol a partir de CO, CO₂ e H₂ consiste en lograr altas concentraciones de etanol en estado estacionario, obteniendo al mismo tiempo una relación alta de los productos etanol a acetato y una productividad alta. Los datos de estado estacionario para la producción de etanol a partir de gases ricos en CO que contenía 20% de H₂, 65% de CO, 10% de CO₂ y 5% de CH₄ usando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, en un CSTR recto (sin células recicladas) se muestran en la Tabla 4. En dicha tabla, GRT se refiere al tiempo de retención gaseoso (relación de volumen de líquido a la velocidad de entrada del flujo gaseoso), LRT se refiere al tiempo de retención de líquidos (relación de volumen de líquido a la velocidad del flujo líquido) y XRT se refiere al tiempo de retención de células (tiempo promedio que las células permanecieron en el reactor). Tal como se indica en la Tabla 4, se obtuvieron concentraciones de etanol de 17,5 a 33 g/l y la productividad de etanol varió en un rango de 14,4 a 21,1 g/l·día. -----

Se observaron resultados similares para la producción de etanol a partir de un gas que no es tan rico en CO. El gas utilizado en el experimento con *C.*

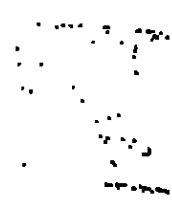


Ljungdahlii, C-01, sin recicladas, cuyos resultados se describen en la Tabla 5, contenía 16% de H_2 , 27% de CO, 6% de CO_2 y 51% de N_2 . Se obtuvieron concentraciones de etanol que variaban en un rango de 11 a 26 g/l con este gas, con 2,0 a 5,0 g/l de acetato como producto secundario. La productividad de etanol varió en un rango de 11,1-20,1 g/l·día. La concentración de células se basa en el peso seco de células en la Tabla 5. _____

Finalmente, los datos de estado estacionario para la conversión de un gas que contenía 50% de H_2 , 45% de CO y 5% de CH_4 , en un CSTR con células recicladas de *C. Ljungdahlii*, O-52 (ATCC, Nº Acceso 55989) se muestran más adelante en la Tabla 6. Se obtuvieron concentraciones de etanol de 18 a 23,5 g/l y concentraciones de acetato de 3,0 a 5,7 g/l. La productividad de etanol varió en un rango de 21,1 a 39,0 g/l·día. _____

EJEMPLO 10. ALTA PRODUCTIVIDAD DE ETANOL EN UN CSTR CON CÉLULAS RECICLADAS Y PRESIÓN_____

Se operó un reactor (Buchi) de alta presión AUTOKLAVTM como un CSTR, con circulación de cultivo y células recicladas utilizando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, para producir etanol a partir de CO, CO_2 e H_2 . El reactor se operó a 30 psig y se le alimentó gas que contenía 62% de H_2 , 31% de CO y 5% de C_2H_6 . El tiempo de retención gaseoso era de 1,14 min (base de presión atmosférica), con un tiempo de retención gaseoso real de 3,5 min. El medio líquido que contenía un exceso de sales, vitaminas y metales traza se alimentó en un reactor de 600 ml con un tiempo de retención de líquidos de 3,6 horas. El valor del pH era de 4,5 y la velocidad de agitación era de 825 rpm. Bajo estas condiciones, la concentración de células era de 8 g/l, la conversión de CO era



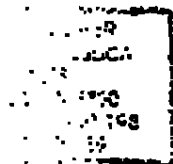
del 90% y la conversión de H_2 era del 40%. El flujo de producto contenía etanol 20 g/l y acetato 2,75 g/l. La productividad de etanol era de 150 g/l·día.-----

En otro reactor (Buchi) de alta presión AUTOKLAV™ operado como un CSTR con circulación de cultivo y células recicladas de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, el reactor se operó a 6 atm (75 psig) y se alimentó con syngas que contenía 55% de H_2 , 30% de CO, 5% de CH_4 y 10% de CO_2 . El tiempo de retención gaseoso fue de 1 min (base de presión atmosférica), con un tiempo de retención gaseoso real de 6,0 min. El medio líquido que contenía un exceso de sales, vitaminas y metales traza se alimentó en el reactor con un tiempo de retención de líquidos de 1,62 hs. El tiempo de retención de células fue de 24 hs, el valor del pH era de 4,5 y la velocidad de agitación era de 800 rpm. Bajo estas condiciones, la concentración de células fue de 2,0 g/l, la conversión de CO era del 95% y la conversión de H_2 era del 60%. El flujo de producto contenía etanol 25 g/l y acetato 3 g/l. La productividad de etanol fue de 369 g/l·d. -----

EJEMPLO 11: ARRANQUE CON UN CULTIVO MADRE EN PRESENCIA DE UN EXCESO DE H_2 -----

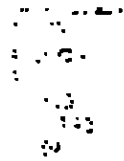
El arranque con una carga de inóculo proveniente de un cultivo madre asegura un inóculo saludable, libre de contaminantes, pero no siempre es adecuado como procedimiento de inoculación debido a la densidad de células relativamente baja empleada, en especial si los parámetros del método, tal como velocidad del gas y velocidad de agitación, son forzados a valores altos demasiado rápido justo después de la inoculación.-----

En este ejemplo se describe el arranque utilizando una carga de inóculo de un cultivo madre. Para preparar los cultivos madre para la inoculación en el



reactor, se hicieron crecer cultivos de *C. ljungdahlii*, cepa C-01 (ATCC N° Acceso 55988) en botellas para suero de 150 ml sobre CO, CO₂ e H₂ en un medio rico que contenía extracto de levadura 1 g/l y tripticasa 1 g/l, en sales y vitaminas. La concentración de vitaminas empleada fue de 0,4 ml/l de medio de una solución acuosa que contenía pantotenato de calcio 50,5 mg/l, d-biotina 20,6 mg/l y tiamina-HCl 50,6 mg/l. Las botellas se incubaron a 37 °C en un incubador con agitación. Los cultivos se hicieron crecer hasta la fase de crecimiento exponencial, determinada por inspección visual. En cada inoculación, se transfirieron aproximadamente 90 ml de cultivo madre de las botellas para suero a 1 litro de medio, lo cual representaba un 9% en volumen de inoculación. A continuación se describe una inoculación adecuada. El procedimiento descrito se puede repetir varias veces con el fin de obtener una buena inoculación.-----

Para obtener dicha inoculación, se agregó Inóculo 90 ml/l a 1 litro de carga de medio basal (se muestra en la Tabla 1) que contenía vitaminas 0,4 ml/l y sales (t = 0). La velocidad de agitación era de 240 rpm, el valor del pH era de 5,3, la temperatura era de 38,5 °C y el tiempo de retención gaseoso (flujo gaseoso continuo) fue de 110 minutos. La alimentación de gases contenía 62% de H₂, 31% de CO y 7% de C₂H₄. Después de 13 hs (t = 13 hs) se observó mínima conversión de CO y a t = 23 hs la velocidad de agitación se incrementó de 240 rpm a 300 rpm. El tiempo de retención gaseoso se disminuyó a 100 minutos a t = 27 hs y luego se efectuó una disminución adicional en el tiempo de retención gaseoso a t = 46 hs. La velocidad de agitación también se incrementó en 100 rpm, con incrementos a t = 28 hs, 59 hs, 72 hs y 85 hs.-----

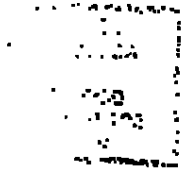


Cuando $t = 110$ hs, el sistema estaba operando con un tiempo de retención gaseoso de 80 minutos y una velocidad de agitación de 600 rpm. La concentración de células era de 0,5 g/l y la conversión de CO era del 35%. Aún no había conversión de H_2 , pero se habían acumulado pequeñas cantidades de etanol y acetato (~1 g/l de cada uno) en el caldo de cultivo del lote. Los esfuerzos realizados hasta este momento estaban centrados en el crecimiento de células en el reactor.-----

El flujo de medio que contenía las mismas concentraciones que el medio basal se inició con una velocidad de 0,4 ml/min a $t = 120$ hs. Luego se inició un programa de incrementos nominales en la velocidad del gas, la velocidad de agitación y la velocidad del medio, tomando al mismo tiempo la precaución de mantener el sistema con un exceso de H_2 . Cuando $t = 210$ hs, la concentración de etanol era de 17 g/l, la concentración de acetato era de 1 g/l, la concentración de células era de 1,6 g/l, la conversión de CO estaba cercana al 100% y la conversión de H_2 era del 90%. La productividad de etanol alcanzó los 11,4 g/l/día. -----

Nuevamente se inició un programa de incrementos graduales en la velocidad del gas. Se efectuaron incrementos concurrentes de vitaminas (véase la Tabla 1) con el fin de llevar la velocidad de adición de vitaminas a 0,7 ml/l de medio. Cuando $t = 610$ hs, el reactor estaba produciendo 20 g/l de etanol y aproximadamente 2 g/l de acetato. La conversión de CO era cercana al 100% y la conversión de H_2 era del 85%. La productividad de etanol alcanzó los 14 g/l/día. -----

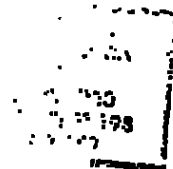
EJEMPLO 12. ARRANQUE CON UN INÓCULO DE UN CSTR YA EXISTENTE -----



El arranque de un CSTR con un inóculo continuo de un CSTR ya existente es mucho más rápido y es más seguro que un arranque a partir de botellas con cultivo madre. Se rearrancó un CSTR que contenía formas aisladas de *C. ljungdahlii*, cepa C-01 (ATCC, N° Acceso 55988), que casi había cesado la producción de etanol y estaba produciendo etanol 2-3 g/l, acetato 7-8 g/l y butanol 0,3 g/l aproximadamente como productos en fase líquida, utilizando un inóculo continuo de un CSTR ya existente.-----

El CSTR del cual se tomó el inóculo estaba produciendo etanol 17 g/l aproximadamente y acetato 1-2 g/l, operando con un tiempo de retención gaseoso de 25 minutos, un tiempo de retención de líquidos de 32 horas, una velocidad de agitación de 650 rpm, una temperatura de 38,5 °C y un pH de 4,66. La concentración de células era de 1,7 g/l, la conversión de CO era esencialmente del 100% y la conversión de H₂ era del 85%. -----

Se inició una adición continua de inóculo ($t = 0$) y, en este momento, la velocidad de agitación se redujo a 500 rpm y el tiempo de retención gaseoso se definió en 38 minutos. El efluente del reactor productivo (0,5 ml/min) sirvió como inóculo continuo para el CSTR que se estaba inoculando, con una inoculación continua sobre un período de varias horas. Cuando $t = 5$ hs (5 hs después de iniciar la inoculación continua), se observó conversión de gas y la velocidad de agitación se incrementó a 700 rpm. La administración continua del inóculo se interrumpió a $t = 28$ hs. Las conversiones de gas mejoraron de forma regular, permitiendo incrementos continuos en la velocidad del gas (tiempo de retención gaseoso disminuido) y un incremento en la velocidad de agitación a 750 rpm. Cuando $t = 30$ hs, la conversión de CO era del 95% y la conversión de H₂ era del 80%. La concentración de etanol era de 13 g/l y la concentración de



acetato era de 1,5 g/l, y se mantuvo constante en 1,4 g/l durante más de 100 horas. Durante este período, la productividad de etanol era de 10 a 15 g/l/día. --

EJEMPLO 13. RECUPERACIÓN FRENTE A DESVIACIONES SEVERAS DEL MÉTODO

Un CSTR con células recicladas de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, con alimentación continua de nutrientes líquidos y gaseosos y que producía 15-35 g/l de etanol y 0-5 g/l de acetato en estado estacionario (por ejemplo, como el Ejemplo 1) puede ser perturbado debido a cambios imprevistos en las condiciones del método, por ejemplo, problemas mecánicos en el reactor. La perturbación del sistema reactor puede ser menor, tal como un incremento breve en la velocidad del gas que provoca una inhibición por sustrato de corto plazo, o mayor tal como un incremento a largo plazo en la velocidad del gas que eventualmente conducirá a una mayor producción de ácido acético y una inhibición del producto ácido acético molecular más severa.

Las perturbaciones de corto plazo se corrigen fácilmente reajustando simplemente el parámetro modificado o desviado (por ejemplo, disminuyendo la velocidad del gas a su nivel original) y monitoreando el progreso del reactor para asegurar que dicha perturbación no hubiera provocado un problema de plazo más prolongado.

Sin embargo, la inhibición del producto ácido acético es un problema más severo. Si el cultivo produce un exceso de ácido acético molecular como resultado de una inhibición por sustrato de largo plazo, la adición de un exceso de nutrientes, acumulación de CO₂ o problemas mecánicos de muchos tipos, primero se debe corregir el problema que llevó a dicho exceso de ácido acético. El exceso de ácido acético, que rápidamente conduce a una inhibición por



producto, se separa del sistema incrementando la velocidad del líquido para lavar el ácido acético (y desafortunadamente etanol) del sistema. Una vez que el nivel de acetato se encuentra por debajo de 3-5 g/l, se restablece la velocidad del líquido y el reactor vuelve a la condición de alimentación de exceso de H_2 o a una limitación por vitaminas o cobalto (con o sin células recicladas). El hecho de restablecer el reactor comprende una reducción en la velocidad del gas para evitar una inhibición por sustrato y/o en la velocidad de agitación antes de la eliminación por lavado y la lisis de las células. Luego se incrementa la velocidad de agitación o la velocidad del gas, como se describe en el Ejemplo 1. _____

En un ejemplo específico, un CSTR, con células recicladas de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, que estaba produciendo etanol y ácido acético a partir de CO , CO_2 e H_2 , comenzó a producir ácido acético como respuesta a un problema mecánico. El reactor de 2100 ml recibía un gas que contenía 62% de H_2 , 31% de CO y 7% de C_2H_6 con un tiempo de retención gaseoso de 15 minutos, y estaba operando con una velocidad de agitación de 600 rpm y a un pH de 4,86. El tiempo de retención de líquidos era de 23 horas y el tiempo de retención de células era de 68 horas. Había una solución de vitamina B (una mezcla acuosa de pantotenato de calcio 50,5 mg/l, d-biotina 20,6 mg/l y tiamina-HCl 50,6 mg/l) en el medio nutriente líquido que contenía también sales y vitaminas a una concentración de 0,4 ml de solución de vitaminas por litro de medio (véase Tabla 2). La concentración de etanol cayó a 7 g/l, en tanto la concentración de acetato aumentó a 7 g/l, condiciones que no eran estables para operar al reactor ni económicamente rentables para la producción de

etanol. La concentración de células era de 2,4 g/l, la conversión de CO era del 85% y la conversión de H₂ era del 25%. —————

La estrategia utilizada para recuperar el reactor consistía de reducir primero de forma dramática la velocidad de alimentación de gases al reactor, seguido de una recuperación gradual del reactor de un exceso de H₂. No se redujo la velocidad del líquido hacia el reactor para solucionar la inhibición por producto en este ejemplo dado que la concentración de acetato no era excesivamente alta. En lugar de ello, se permitió que la concentración de acetato disminuyera de una forma más gradual hasta niveles no inhibidores con reducción en la velocidad del flujo gaseoso y posterior operación en presencia de un exceso de H₂. El procedimiento específico para recuperar el reactor se describe a continuación. —————

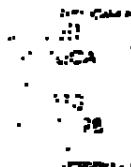
Se interrumpió la alimentación de células recicladas y se redujo dramáticamente la velocidad del gas en un 70% hasta un tiempo de retención gaseoso de 62 minutos, en tanto sólo se efectuaron ajustes ligeros en el tiempo de retención de líquidos de 23 a 30 horas ($t = 0$). No se cambió la concentración de vitaminas en el medio. Con este cambio en la velocidad del gas, la conversión de CO aumentó al 98% y la conversión de H₂ aumentó al 80%. Más importante aún era que el sistema presentaba un exceso de H₂, evidenciado por una disminución de CO₂ en el gas de salida del 19 al 5%. Cuando comenzó el exceso de H₂, la concentración de acetato disminuyó en tanto la concentración de etanol aumentó. Cuando $t = 66$ hs (66 hs después de interrumpir la alimentación de células recicladas), por ejemplo, la concentración de acetato había disminuido a 4 g/l y la concentración de etanol había aumentado ligeramente a 7,5 g/l. —————



La presencia del exceso de H_2 (y la menor concentración de acetato) permitió efectuar subsiguientes incrementos en la velocidad del gas, primero lentamente y luego a una velocidad mayor. Cuando $t = 215$ hs, la retención de gases era de 29 minutos, la concentración de etanol era de 12 g/l y la concentración de acetato era de 3 g/l. La productividad de etanol era de 8 g/l-día. En el gas de salida había un 6% de CO_2 , la conversión de CO era del 98% y la conversión de H_2 era del 80%. Cuando $t = 315$ hs, la concentración de etanol era de 16 g/l y la concentración de acetato era de 4 g/l, nuevamente con una buena conversión de gases y un tiempo de retención gaseoso de 20 minutos. La productividad de etanol era de 11 g/l/día. Cuando $t = 465$ hs, la concentración de etanol había alcanzado los 20 g/l, con 3,5-4 g/l de acetato. La productividad de etanol era de 16 g/l/día. El tiempo de retención gaseoso había caído a 16 minutos, con conversiones de CO e H_2 del 95 y 73%, respectivamente. Estas condiciones se mantuvieron durante casi 200 horas de funcionamiento continuo, con lo cual se demostraba que el sistema del reactor había recuperado su capacidad para producir etanol y que había retenido esencialmente las condiciones de funcionamiento anteriores.-----

EJEMPLO 14. MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL CON SOBREALIMENTACIÓN DE CO-----

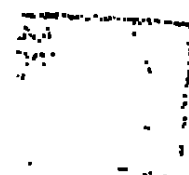
Se llevó a cabo un experimento simple en reactor continuo con agitación de alta presión con células recicladas para demostrar el cambio de producción de ácido acético a producción de etanol debido a la presencia de altas concentraciones CO. Antes de este experimento, el reactor, que contenía *C. ljungdahlii*, cepa C-01, operaba a una presión de 20-25 psig y recibía una alimentación de gases que contenía 57% de H_2 , 36% de CO y 7% de C_2H_6 . El



tiempo de retención gaseoso era menor que 2 minutos, el tiempo de retención de líquidos era de 38 horas, el tiempo de retención de células era de 28 horas, la velocidad de agitación era de 600 rpm y la temperatura era de 38 °C. Bajo estas condiciones, la conversión de CO era variable y promediaba un 85% y la conversión de H₂ era variable y promediaba un 20%. La concentración de células era de 2,5 g/l aproximadamente y el flujo de producto contenía etanol 9 g/l y acetato 3 g/l. _____

Como un primer paso en la preparación para la prueba, se incrementó el tiempo de retención gaseoso con el fin de asegurar que no hubiera un exceso de CO. La presión se mantuvo en 23-24 psig. Se efectuó un seguimiento del valor del pH por un tiempo suficiente como para asegurar que fuera estable en el rango de operación normal de 4,5-4,6. Luego se mezcló CO puro con la alimentación gaseosa regular para obtener una alimentación de gases de 47% de H₂, 47% de CO y 6% de C₂H₆, con un tiempo de retención gaseoso de 2,3 minutos. El pH, la composición del gas de salida y el flujo de producto en el reactor se monitorearon en función del tiempo. _____

En la Tabla 7 se muestran los cambios en el pH y en las composiciones de producto en función del tiempo después de la adición de CO adicional al sistema. Treinta minutos después de la adición de CO, el pH en el reactor había aumentado a 5,25 y el cultivo había cambiado de 1,54 g/l (0,0257 mol/l) de acetato a 1,12 g/l (0,0243 mol/l) de etanol. El incremento en el pH tuvo lugar como resultado de la conversión de ácido acético libre en etanol. Este cambio estuvo acompañado de una disminución en la conversión de CO del 91% al 71%. Al disminuir la velocidad de circulación del cultivo de 0,4 gpm a 0,15 gpm,

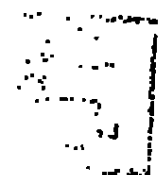


caía el valor del pH en el reactor, pero se conservaron las concentraciones de etanol y acetato. —————

Cincuenta minutos después de la introducción de CO, la concentración de etanol era de 11,29 y la concentración de acetato era de 1,75 g/l. En este momento, se interrumpió la alimentación del exceso de CO, la concentración de etanol y el valor del pH comenzaron a disminuir y la concentración de acetato comenzó a aumentar. La disminución en el valor del pH se debía a la conversión de etanol en ácido acético molecular. Por lo tanto, es reversible el cambio de etanol-ácido acético por medio de una sobrealimentación de CO. —

EJEMPLO 15. RECICLAJE DE AGUA PARA MINIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ACETATO —————

El método de reciclar el agua nuevamente hacia el biorreactor de fermentación durante la destilación para recuperar etanol es esencial para minimizar la producción de efluentes y para maximizar el rendimiento de etanol del reactor y también para limitar la producción de ácido acético. Se encontró que la destilación era el método más económico para concentrar los 15-35 g/l de etanol obtenidos del etanol 95%. Después se utiliza una adsorción con tamices moleculares para concentrar aún más el etanol hasta la concentración deseada. Con la destilación, se produce etanol 95% como producto en la cabeza de destilación. Se genera agua como producto de la cola de destilación. El producto de la cola de destilación contiene el ácido acético del reactor producido durante la fermentación (acetato 3-5 g/l) y cualquier nutriente que no se agotó durante la fermentación o que no se destruyó con el calor de la destilación, tal como metales traza y otros minerales. El reciclaje de nutrientes minimiza la cantidad de efluentes, que deben ser tratados, así como la cantidad



de nutrientes que se deberán agregar posteriormente al biorreactor de fermentación. El reciclaje de acetato impide la formación de ácido acético adicional al establecerse un equilibrio entre el etanol y el ácido acético. Por consiguiente, no hay una producción neta de ácido acético con el reciclaje de agua. El reciclaje de más de 3-5 g/l de acetato puede dar como resultado una inhibición por ácido acético en el reactor. Por lo tanto, cuando se emplea agua que contiene acetato reciclado, se puede convertir el sustrato CO, CO₂ e H₂ en etanol como único producto.-----

En la Tabla 8 se muestran los resultados de una fermentación de gases que contenían 50% de CO, 45% de H₂ y 5% de CH₄; con *C. ljungdahlii*, cepa 0-52, con reciclaje de agua. En estos experimentos, el permeato de la filtración con fibras huecas usada para las células recicladas se envió a destilación. Después de separar el etanol, el agua se filtró con un filtro de 0,2 micrones con el fin de eliminar todos los productos secundarios precipitados. La fracción de agua reciclada con respecto al agua total (como medio) alimentada en el reactor en estos experimentos varió en un rango de 25-100%. El experimento con un 100% de agua reciclada duró casi 500 horas o aproximadamente 20 tiempos de retención de líquidos. Tal como se observa en los resultados con 100% de agua reciclada, no se observó una producción neta de ácido acético. De hecho, eventualmente se observó consumo de una pequeña cantidad de ácido acético. La productividad de etanol varió en un rango de 12 a 27 g/l/día. --

EJEMPLO 16. SISTEMA DE CSTR DE DOS ETAPAS CON ALIMENTACIÓN DE PANTOTENATO EN LA ETAPA DE CRECIMIENTO -----

La alimentación apropiada de pantotenato en la etapa de crecimiento constituye una variable que debe ser optimizada. Los resultados típicos de un

Reactor de Etapa Crecimiento usando un cultivo de *C. ljungdahlii*, C-01, se describieron en los Ejemplos 11 y 12, con la excepción que se produciría un poco más de ácido acético en este reactor dado que se alimentó pantotenato o cobalto adicional en la etapa de crecimiento con el fin de asegurar un cultivo saludable y estable. La concentración de vitaminas empleada era de 0,7-0,8 ml/l de medio de una solución acuosa que contenía pantotenato de calcio 50,5 mg/l, d-biotina 20,6 mg/l y tiamina-HCl 50,6 mg/l. El CSTR en etapa de producción con células recicladas es alimentado con el efluente del reactor en etapa de crecimiento y produce etanol como producto predominante. La concentración de pantotenato alimentado a este reactor es mucho menor que en la etapa de crecimiento, solamente 0,1-0,2 ml de vitaminas totales/l de medio de una solución acuosa que contenía pantotenato de calcio 50,5 mg/l, d-biotina 20,6 mg/l y tiamina-HCl 50,6 mg/l. El tiempo de retención gaseoso en esta etapa de producción era de 11-30 minutos, el tiempo de retención de líquidos era de aproximadamente 20 horas, el tiempo de retención de células era de 30-50 horas y la velocidad de agitación era de 800-900 rpm. El valor del pH era de 5,0 y la temperatura era de 38 °C. Una vez que el reactor alcanzó el estado estacionario, el tiempo de retención gaseoso se mantuvo constante en 11 minutos, el tiempo de retención de líquidos se definió en 19 horas, el tiempo de retención de células era constante de 37 horas y la velocidad de agitación era de 900 rpm. La conversión de CO promedió un 96% y la conversión de H₂ promedió un 60%. La concentración de etanol se mantuvo constante en 25-30 g/l, con presencia de acetato aproximadamente a razón de 3 g/l. La productividad de etanol era 31,6-37,9 g/l/día.

EJEMPLO 17. REGULACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN PARA EVITAR LA ADAPTACIÓN A BAJAS CONCENTRACIONES LIMITANTES DE PANTOTENATO DE CALCIO-----

La adaptación del cultivo en el biorreactor de fermentación a bajas concentraciones limitantes de pantotenato de calcio se puede evitar regulando los parámetros de la fermentación (velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación, presión parcial de H_2) al tiempo que se evitan los grandes cambios en los nutrientes, sino manteniendo una concentración relativamente constante de nutrientes en la alimentación, de la siguiente manera.-----

Durante el arranque de un CSTR de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo®, el cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, fue alimentado con un flujo de nutrientes líquido que contenía las vitaminas, minerales traza y sales necesarias para proveer nutrición al cultivo. La concentración de pantotenato en el medio de nutrientes era de 20 $\mu g/l$, una concentración que cuando se acopla a una baja velocidad de alimentación de medio asegura la administración de más de 100 μg de pantotenato de calcio por gramo de células producidas (exceso de pantotenato) debido a la baja producción de células en el biorreactor. De manera similar, la concentración de cobalto en el medio era de 1 ppm, una concentración que también asegura la presencia de un exceso de cobalto. En su lugar, la presión parcial de H_2 en el gas de salida se mantuvo con un exceso de 0,55 atmósferas por alimentación con un gas que no contenía CO_2 , 63,3% de H_2 , 31,4% de CO y 5,3% de C_2H_6 , con lo cual se obtuvo una relación de H_2 alimentado/(2 CO convertido y 3 CO_2 convertido) mayor que 1 y por regulación cuidadosa de la velocidad de alimentación de gases y la



velocidad de agitación para lograr una conversión de CO mayor que 95% y una conversión de H₂ mayor que 80%. Al tiempo que estas altas conversiones se logran, la concentración de células se acumula desde un nivel inicial cercano a 0 g/l a 1,5 g/l aproximadamente. -----

Dado que la concentración de pantotenato se mantiene constante durante este arranque, los μg de pantotenato por gramo de células producidas disminuye gradualmente hasta que es menor que 15 μg de pantotenato/g de células producidas, una condición que luego será limitante por pantotenato. El sistema crece entonces hacia una limitación por pantotenato. Se obtiene una relación alta de productos etanol:acetato durante todo el arranque debido al exceso de H₂. Como alternativa, se permite que el reactor produzca ácido acético durante las etapas tempranas de arranque, con una relación de producto que luego se lleva bajo control mediante una limitación por pantotenato. -----

EJEMPLO 18. LIMITACIÓN POR COBALTO EN EL REACTOR -----

Un cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa ERI2, fue alimentado con 62 a 3500 μg de cobalto/g de células producidas durante la producción de ácido acético a partir de CO, CO₂ e H₂, una condición en la cual no había limitación por cobalto en el reactor (o cualquier otra limitación excepto la capacidad de transferencia de gases al cultivo), y no se encontró etanol en el flujo de producto. Durante la limitación por cobalto en la producción de etanol a partir de CO, CO₂ e H₂, el cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, fue alimentado con 33 a 48 μg de cobalto/g de células producidas, manteniendo los demás nutrientes en exceso. Bajo estas condiciones, la cepa C-01 produjo etanol 18 a 26 g/l y acetato 4 g/l aproximadamente. -----

EJEMPLO 19. FORMA DE EVITAR LA ADAPTACIÓN A BAJAS CONCENTRACIONES LIMITANTES DE COBALTO

La adaptación a una baja concentración limitante de cobalto se puede evitar regulando los parámetros de la fermentación (velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación, contenido de CO_2), evitando al mismo tiempo no solo grandes cambios en los nutrientes, sino manteniendo una concentración de nutrientes relativamente constante en la alimentación, de la siguiente manera.

Durante el arranque de un CSTR de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo®, el cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, fue alimentado con un flujo de nutrientes líquido que contenía las vitaminas, minerales traza y sales necesarias como para proveerle nutrición al cultivo. La concentración de cobalto en el medio de nutrientes era de 75 ppb, una concentración que cuando se acopla con una velocidad baja de alimentación de medio asegura una alimentación mayor de 50 μg de cobalto por g de células producidas (exceso de cobalto) debido a la baja producción de células en el biorreactor.

De manera similar, la concentración de pantotenato en el medio era de 20 $\mu\text{g/l}$, una concentración que también asegura un exceso de pantotenato. En su lugar, la presión parcial de H_2 en el gas de salida se mantuvo con un exceso de 0,55 atmósferas mediante la alimentación de un gas que contenía grandes cantidades de H_2 y nada de CO_2 y regulando cuidadosamente la velocidad de alimentación de gases y la velocidad de agitación para obtener una conversión de CO mayor que un 95% y una conversión de H_2 mayor que un 80%. Dado que estas conversiones altas se logran con el tiempo, la concentración de células se incrementa desde un nivel inicial cercano a 0 g/l hasta

CO
LA PL
DUES
2 TV F
- 101
101

aproximadamente 1,5 g/l. Dado que la concentración de cobalto se mantiene constante durante este arranque, los μg de cobalto por g de células producidas disminuyen gradualmente hasta por debajo de 50 μg de cobalto/g de células producidas, una condición que luego será de limitación por cobalto. El sistema evoluciona entonces hacia una limitación por cobalto. Se obtienen grandes rendimientos de etanol en todo el período de arranque empleando un exceso de H_2 en la alimentación. Como alternativa, se puede permitir la producción de ácido acético en el reactor durante las etapas tempranas del arranque, llevando luego la relación de producto bajo control por limitación por cobalto.-----

EJEMPLO 20. SOBREALIMENTACIÓN DE HIDRÓGENO -----

Durante la operación de un reactor (Buchi) de laboratorio AUTOKLAVTM operado como un CSTR con recirculación de líquidos y células recicladas, el cultivo de *C. ljungdahlii* se operó con un exceso de las vitaminas, minerales traza y sales necesarias para proveerle nutrición al cultivo. El reactor se operó con un exceso de H_2 en la alimentación, de manera tal que la relación de los moles de H_2 alimentados con respecto a la suma de dos veces los moles de CO convertido y tres veces los moles de CO_2 convertido era de 5,67. Si esta relación no era mayor que 1,0, no puede haber exceso de H_2 en el reactor y no es posible una producción de etanol debida a la presencia de un exceso de H_2 . Aún más, la presión parcial de H_2 en el gas de salida era de 2,61 atm, un nivel que excede el requerimiento de 0,4 atm para la producción de etanol debida al exceso de H_2 . Finalmente, la relación de presión parcial de H_2 a presión parcial de CO_2 en el gas de salida era de 10,88, un nivel que es mayor que 3,0 y asegura la presencia de suficiente H_2 como para utilizar todo el carbono disponible. Bajo estas condiciones, el reactor produjo casi 26 g/l de etanol y



menos que 3 g/l de acetato. La productividad de etanol era mayor que 200 g/l/día. Si no se cumple con algunos de estos criterios, el reactor no produce etanol debido a la presencia de un exceso de H_2 . Otro aspecto de la abundancia de H_2 es que da como resultado ferredoxina reducida adicional por oxidación con una hidrogenasa. —————

EJEMPLO 21. MITIGACIÓN DE UNA CO INHIBICIÓN POR SUSTRATO ———

Un CSTR de laboratorio New Brunswick Scientific Bioflo® que funcionaba a una velocidad de agitación de 800 rpm muestra una concentración de salida de CO del 10% cuando anteriormente había funcionado con tan solo un 5% de CO en la salida de gases. Con la disminución de la velocidad de agitación a 600 rpm, se eliminó la inhibición por CO y la concentración de CO de salida volvió a ser del 5%. Esto da como resultado una mayor captación de H_2 , una condición necesaria para utilizar de manera eficiente todo el gas alimentado al reactor. —————

EJEMPLO 22. TRANSFERENCIA DE MASA —————

Como ejemplo de un exceso transferencia de masa que conduzca a la producción de etanol, se puede considerar un CSTR de laboratorio con células recicladas que contiene *C. ljungdahlii*, cepa ERI2, funcionando sin limitaciones por nutrientes o exceso de H_2 o CO en la alimentación gaseosa. Es decir, el pantotenato se alimenta a una velocidad de más de 100 μ g de pantotenato de calcio por gramo de células producidas y el cobalto se alimenta a una velocidad de más de 100 μ g por gramo de células producidas. Hay H_2 en el gas de salida a 0,2 atm aproximadamente y la velocidad de captación específica de CO es menor que 0,3 mmol de CO/g células/min. La velocidad de agitación es de 800 rpm. Bajo estas condiciones, el cultivo solamente produce ácido acético (no

hay etanol en el flujo de producto). Si la velocidad de agitación se aumenta rápidamente a 900 rpm o se incrementa la velocidad del gas en aproximadamente un 10%, se observa etanol en el flujo de producto, hasta que la concentración de células aumenta con el fin de captar el gas o hasta que el cultivo muere debido a una inhibición por sustrato. -----

EJEMPLO 23. CONTROL DE LA INHIBICIÓN POR PRODUCTO DE ÁCID ACÉTICO -----

En un CSTR de laboratorio que está produciendo 8 g/l de ácido acético y 10 g/l de etanol, se reduce el tiempo de retención de líquidos de 24 horas a 12 horas por un período de 36 horas en un intento por eliminar por lavado el exceso de ácido acético del reactor que está limitando la capacidad del cultivo para producir más etanol. Todas las demás condiciones de operación y de nutrientes en el reactor se mantienen constantes. Después de este período de tiempo, el tiempo de retención de líquidos se vuelve a 24 horas y como resultado de ello se obtiene un flujo de producto que contiene 3 g/l de acetato y 15 a 25 g/l de etanol. Se necesitan varios intentos por reducir el tiempo de retención de líquidos con el fin de solucionar la inhibición por producto. Como alternativa, se agrega H_2 a la alimentación de gases con el fin lograr un control del exceso de H_2 , dado que el exceso de CO_2 también puede conducir a la producción de ácido acético en favor de etanol. Estas modificaciones impiden una producción excesiva de ácido acético y por consiguiente impide una relación pobre de productos y una baja productividad de etanol. A continuación, se retorna al uso de un exceso de H_2 en la alimentación gaseosa o a una concentración limitante de nutrientes en fase líquida. -----

EJEMPLO 24. SOBREALIMENTACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO

Cuando se alimentaba un cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa ERI2, con un exceso de nutrientes (exceso de pantotenato y cobalto) y sin abundancia de H₂ en la alimentación gaseosa, presentaba una velocidad de captación específica de CO de 0,23 a 0,48 mmol/g/min y no había etanol en el flujo de producto. Sin embargo, cuando el cultivo de *C. ljungdahlii*, cepa C-01, era alimentado de manera similar con un exceso de nutrientes sin abundancia de H₂ en la alimentación gaseosa, pero se encontraba bajo una condición en la cual una sobrealimentación de CO estaba causando la producción de etanol, la velocidad de captación específica de CO era de 0,67 a 1,34 mmol/g/min. Bajo estas condiciones, el cultivo produjo 9,9 a 12,0 g/l de etanol y 2,6 a 2,7 g/l de acetato.

EJEMPLO 25: CONTROL DE LA RELACIÓN DE PRODUCTOS CON PURGA DE CÉLULAS

Se produce una fermentación del sustrato gaseoso (30% de CO, 15% de H₂, 10% de CO₂, 45% de N₂) en un CSTR (pH = 5,0, Temperatura = 38 °C, Presión = 20 psig) utilizando *C. ljungdahlii*, cepa C-01, con células recicladas (tiempo de retención de células = 40 horas y tiempo de retención de líquidos = 6 horas) y el crecimiento del cultivo no está limitado por cobalto, pantotenato de calcio o ningún otro nutriente. A medida que va creciendo el cultivo, se alcanza una densidad de células tal que la captación específica (mmol de CO por gramo de células secas por minuto) es inferior a 0,5 y se produce ácido acético con preferencia antes que etanol. Con el fin de prevenir esto, se incrementa la purga de células para impedir un incremento en la densidad de células, de manera tal que la concentración estable de células se mantiene

suficientemente baja como para mantener una captación específica mayor que 0,5 mmol de CO por gramo de células secas por minuto. Al hacer esto, el tiempo de retención de células se reduce a un valor entre 6 y 25 horas. ———

Tabla 1. Medio para la producción de etanol ———

Componente	Cantidad por litro
FeCl ₂ 4 H ₂ O 2 g/l	10 ml
H ₃ PO ₄ 85%	0,05 ml
Metales traza MPFN ^a	20 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,60 g
NH ₄ Cl	2,00 g
NaCl	0,20 g
KCl	0,15 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,50 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,20 g
Cisteína-HCl·H ₂ O	0,25 g
Solución de vitaminas ^b	variable ^c

^a Metales traza MPFN contienen (por litro de solución): 10 ml de H₃PO₄ 85%, 0,10 g de ZnSO₄·7H₂O, 0,03 g de MnCl₂·4H₂O, 0,3 g de H₂BO₃, 0,20 g de CoCl₂·6H₂O, 0,02 g de CuCl₂·H₂O, 0,04 g de NiCl₂·6H₂O, 0,03 g de NaMoO₄·2H₂O, 2,00 g de FeCl₂·4H₂O, 0,01 g de Na₂SeO₃ y 0,10 g de Na₂WO₄·2H₂O ———

^b La solución de vitaminas contiene d-biotina 20,6 mg/l, tiamina-HCl 50,6 mg/l y ácido d-pantoténico 50,5 mg/l, sal de calcio ———

^c Varía considerablemente de 0,3 - 0,5 ml en el momento de la inoculación hasta tanto como 0,7-0,8 ml a velocidades altas de gases ———

Tabla 2 Comparación resumida de los parametros del método y resultados de los ejemplos de metodos de control

1. 7. 1950

28

Tabla 3 Resumen del cambio de producto con cepas de *Clostridium ljungdahlii*

<i>C. ljungdahlii</i>	Medio	Conc. células*	Conversión de gases		Concentración de Producto	
	Limitación		CO	H ₂	Etol	Acetato
ERI2	Aumento de ácido acético	1,1	90	80	0	10
ERI2	Limitación por pantotenato	0,3	88	20	2,5	0
ERI2	Aumento de ácido acético	0,55	90	85	1,0	5,5
ERI2	Limitación por pantotenato	0,5	90	20	10	1,0
ERI2	Aumento de ácido acético	0,8	100	93	1	7
ERI2	Limitación por cobalto	1,3	80	20	9	3
C-01	Aumento de ácido acético	1,2	96	90	1	8
C-01	Limitación por pantotenato	0,8	60	30	4	0
C-01	Aumento de ácido acético	1,2	96	90	<1	9
C-01	Limitación por cobalto	2,5	80	20	17	2
PETC	Aumento de ácido acético	0,8	65	55	2	10
PETC	Limitación por cobalto	1,0	95	55	8	1

* En base al peso seco de células

Tabla 4 Datos de estado estacionario para la conversion de un gas rico en CO en etanol con *C. ljungdahlii*, cepa C-01 -

GRT	LRT	Velocidad de agitación	Conc. Células*	Conversión de gases (%)		Productos(g/l)		Productividad de etanol
(min)	(hs)	(rpm)	(g/l)	CO	H ₂	Etanol	Acetato	(g/l/día)
13	32,4	700	2,44	91	57	21,6	3,9	16,0
11,93	25,7	750	2,51	92	54	20,6	3,6	19,2
12,67	25,6	750	2,60	93	61	18,7	4,7	17,6
10	24,5	750	2,75	92	43	20,4	6,1	20,0
11,54	23,8	750	2,65	92	40	20,4	5,3	20,6
12,10	23,8	750	2,77	88	18	21	3,1	21,1
13,8	23,8	750	2,70	90	25	18	2,5	18,2
12,7	23,8	750	2,70	92	35	20	3,8	20,2
13,3	24,0	800	2,70	85	10	17,5	5,0	17,5
14,81	31	750	2,50	92	30	25	2,5	19,4
16,9	31	750	3,60	90	18	23	3,0	17,8
18,5	33	750	2,60	94	50	24	3,5	17,5
17,2	34	750	2,50	91	40	24	3,5	16,9
18,5	34	750	2,30	95	63	23	4,0	16,2
19,2	40,6	750	2,70	94	50	28,5	4,0	17,4
19,0	55	750	2,70	94	20	33	4,0	14,4

* En base al peso seco de células

470

747

TABLA 5 Datos de estado estacionario para la conversion de un gas, que contiene 27% de CO, 16% de H₂, 51% N₂, en etanol con *C. ljungdahlii*, cepa C-01. Sin celulas recicladas

GRT	LRT	Velocidad de agitación	Conc. Células*	Conversión de gases(%)		Productos (g/l)		Productividad de etanol
(min)	(hs)	(rpm)	(g/l)	CO	H ₂	Etanol	Acetato	(g/l/día)
8,89	23,8	750	2,3	84	57	11	2,5	11,1
8,3	23,8	900	2,6	89	55	12	2,0	12,1
8,3	27,7	900	2,7	89	47	15	3,0	13,0
7,1	33,3	900	3,0	86	37	19	3,0	13,7
7,4	33,3	900	3,0	87	40	19,5	3,0	14,1
6,34	33,3	900	3,0	86	37	21	3,5	15,1
6,18	33,3	900	3,0	86	41	20,9	3,1	15,1
5,72	34,3	900	3,0	85	40	22,1	3,8	15,5
5,12	33	900	3,7	85	40	25,0	4,0	18,2
4,59	33	900	4,1	83	33	25	3,5	18,2
4,59	29	900	4,0	80	35	23	4,0	19,0
4,76	29	900	3,9	90	35	19	5,0	15,7
4,25	28	900	4,2	80	30	23	3,0	19,7
5,5	37	900	3,4	84	40	23	3,0	14,9
5,26	31	900	3,8	84	50	23	3,0	17,8
5,71	31	900	3,7	80	28	26	3,5	20,1
6,25	31	900	3,75	82	30	25,5	3,0	19,7
6,66	31	900	3,6	86	64	22	4,0	17,0

747

992

Tabla 6 Datos de estado estacionario para la conversión de un gas, que contiene 50% H₂, 45% de CO y 5% CH₄, en etanol con la forma aislada O-52 en un CSTR con células recicladas

GRT	LRT	Velocidad de agitación	Conc Células*	Conversión de gases(%)		Productos (g/l)		Productividad de etanol
(min)	(hs)	(rpm)	(g/l)	CO	H ₂	Etanol	Acetato	(g/l/día)
12,5	46,4	23,2	3,8	96,3	81,2	20,4	4,4	21,1
9,7	43,2	17,3	4,9	86,7	49,9	21,1	3,5	29,3
9,2	43,2	17,3	4,6	89,4	64,5	20,5	5,1	28,4
7,5	43,2	17,3	5,0	81,8	42,1	22,2	3,7	30,8
9,2	49,4	17,3	4,6	85,3	52,1	21,1	4,4	29,3
8,4	46,0	16,1	4,5	85,2	61,4	20,8	5,1	31,0
6,8	54,3	16,3	4,7	84,7	57,7	23,4	5,7	34,5
7,2	54,3	16,3	4,0	83,1	55,2	19,0	4,4	28,0
7,4	54,3	16,3	5,0	86,6	66,7	21,9	5,5	32,2
6,4	55,6	16,7	5,6	83,3	53,1	23,5	4,9	33,8
6,2	41,6	14,5	5,7	82,5	55,0	20,1	5,0	33,3
6,0	41,6	14,5	6,0	82,5	50,0	21,5	3,0	35,6
6,0	34,2	12,0	5,7	84,0	56,0	19,5	4,5	39,0
5,7	34,2	12,0	5,7	81,0	45,0	18,0	4,5	36,0

* En base al peso seco de células

100

100

Tabla 7 Análisis de pH y muestras de líquido en el cambio de acetato a etanol en presencia de un exceso de CO

Tiempo	pH	Conc de células* (g/l)	Etanol (g/l)	Acetato (g/l)	Butanol (g/l)
0	4,69	2,4	10,3	3,1	0,3
30	5,28		11,4	1,5	0,3
35	5,25	2,4	11,6	1,6	0,3
50	4,98		11,3	1,8	0,3
80	4,73	2,4	10,9	2,9	0,3

* En base al peso seco de células

100

43

724

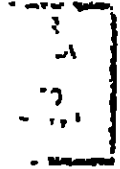
Tabla 8 Datos de la fermentación de gases por la forma aislada O-52 con reciclaje de células y agua

Tiempo (hs)	% agua reciclada	Conc células*(g/l)	Conversión de gases		Productos			Productivida d de etanol (g/l/día)
			CO (%)	H ₂ (%)	Etanol (g/l)	Acetato (g/l)	Acetato neto (g/l)	
0-75	25	2,1	95	68	12	4	4	12
75-193	50	2,1	95	75	15	6	5	15
193-462	75	2,1	92	60	17	5	4	17
462-554	50	1,3	85	30	17 → 13	5	3	12-16
554-669	75	2,6	92	75	13 → 19	5	3	12-18
669-943	100	3,0	92	70	23	6	1	23
943-1087	100	3,0	92	60	23	6	0	23
1087-1232	100	2,7	92	60	23	6	-0	23
1232-1385	100	3,0	91	60	27	6	-1	27
1375-1534	100	3,5	88	35	23	5	0	23

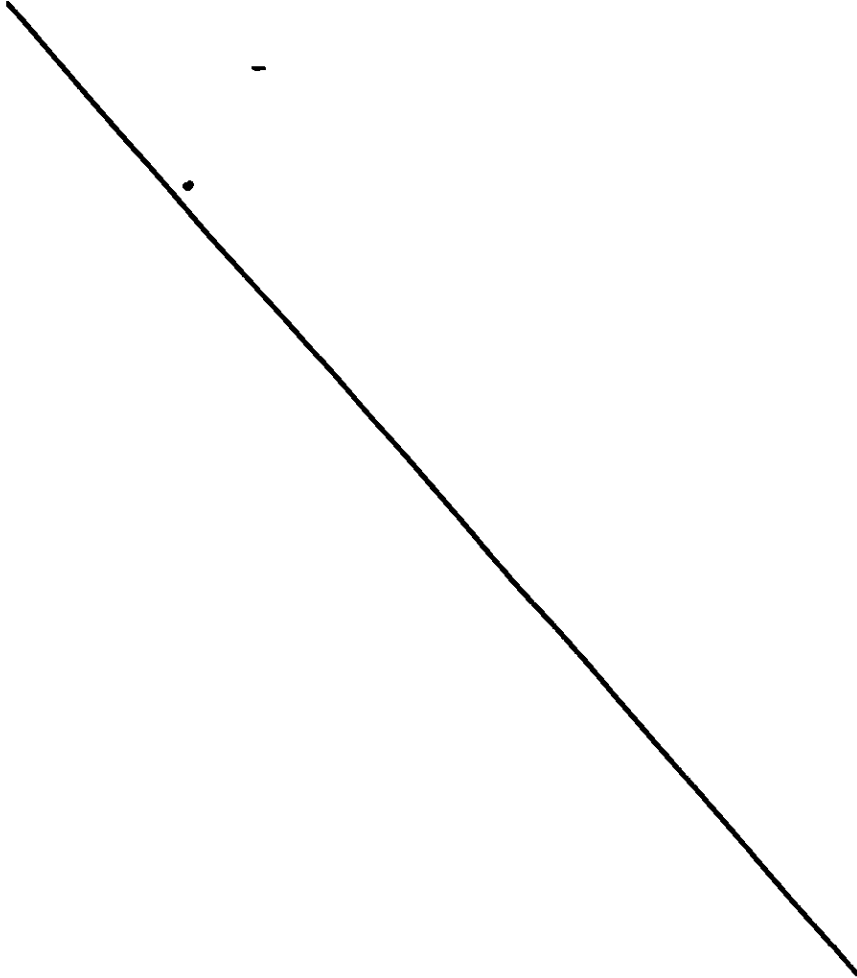
* En base al peso seco de células

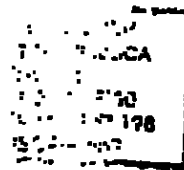
100

17



Todos los documentos publicados se incorporan en este documento a modo de referencia. Se incluyen numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención en la memoria descriptiva identificada anteriormente y se considera que serán obvias para el especialista en el arte. Dichas modificaciones y alteraciones de las composiciones y los métodos de la presente invención están comprendidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas en este documento _____



**REIVINDICACIONES:**

1. Un método estable, continuo para producir etanol a partir de la fermentación bacteriana anaeróbica de un sustrato gaseoso, comprendiendo dicho método:-----

el cultivo en un biorreactor de fermentación anaeróbica de bacterias acetogénicas en un medio de nutrientes líquido y el suministro a dicho biorreactor de un sustrato gaseoso que comprende por lo menos un gas reductor seleccionado del grupo formado por monóxido de carbono e hidrógeno; y -----

la manipulación de dichas bacterias en dicho biorreactor por reducción del potencial redox, o por aumento de la relación de NAD(P)H a NAD(P), en el caldo de fermentación después que dichas bacterias alcanzan una concentración estable de células en dicho biorreactor, donde dicha concentración de ácido acético libre en dicho biorreactor es menor que 5 g/l de ácido libre, -----

donde dichos pasos de cultivo y manipulación provocan que dichas bacterias en dicho biorreactor produzcan etanol en un caldo de fermentación con una productividad mayor que 10 g/l por día y donde se produce tanto etanol como acetato en dicho caldo de fermentación en una relación de etanol a acetato que varía en un rango de 1:1 a 20:1. -----

2. El método acorde con la cláusula 1, donde dicho biorreactor de fermentación comprende un reactor de crecimiento que alimenta dicho caldo de fermentación a un segundo biorreactor de fermentación en el cual se produce la mayor parte de dicho etanol. -----

3. El método acorde con la cláusula 1, que además comprende los pasos de retirar dicho caldo de fermentación de dicho biorreactor, destilar etanol de dicho caldo y recuperar dicho etanol. _____

4. El método acorde con la cláusula 3, que además comprende los pasos de reciclar el agua que contiene acetato de dicho paso de destilación hacia el biorreactor nuevamente. _____

5. El método acorde con la cláusula 1, donde dichas bacterias se seleccionan del grupo formado por: *Acetobacterium woodii*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium acetium*, *C. acetobutylicum*, *C. thermoaceticum*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Peptostreptococcus productus*. _____

6. El método acorde con la cláusula 5, donde dicha *Clostridium ljungdahlii* se selecciona entre las siguientes cepas: PETC, ERI2, O-52 y C-01. _____

7. El método acorde con la cláusula 1, donde dicho sustrato gaseoso se selecciona del grupo formado por (a) monóxido de carbono, (b) monóxido de carbono e hidrógeno, (c) dióxido de carbono e hidrógeno y (d) monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno. _____

8. El método acorde con la cláusula 7, donde dicho sustrato además comprende nitrógeno o metano. _____

9. El método acorde con la cláusula 1, donde dicho paso de manipulación además comprende la alteración de por lo menos un parámetro seleccionado del grupo formado por: contenido del medio de nutrientes, velocidad de alimentación de los nutrientes, velocidad de alimentación del medio acuoso, presión de operación, pH de operación, contenido del sustrato gaseoso, velocidad de alimentación de gases, velocidad de agitación del caldo de



fermentación, paso de inhibición por producto, densidad de células, inhibición por sustrato y combinaciones de los mismos. _____

10. El método acorde con la cláusula 9, donde dicho paso de manipulación comprende elevar el valor del pH de dicho cultivo por encima de 4,5. _____

11. El método acorde con la cláusula 9, donde dicho paso de manipulación comprende una purga periódica de células bacterianas de dicho biorreactor hasta una concentración de células menor que dicha concentración estable que utiliza todos los sustratos de nutrientes y gas reductor en dicho biorreactor. _____

12. El método acorde con la cláusula 9, que comprende incrementar la velocidad de alimentación acuosa cuando la porción de ácido acético libre del acetato presente en el caldo de fermentación excede 2 g/l, con lo cual se inhibe cualquier incremento no deseado en la concentración de dicho ácido acético libre. _____

13. El método acorde con la cláusula 9, que comprende la reducción de dicha velocidad de alimentación del sustrato gaseoso con el fin de eliminar el exceso de monóxido de carbono, para revertir la inhibición por sustrato y mantener dicha productividad. _____ *acabo?*

14. El método acorde con la cláusula 9, donde se reduce dicha velocidad de *da* agitación para eliminar el exceso de monóxido de carbono, para revertir la inhibición por sustrato y mantener dicha productividad. _____

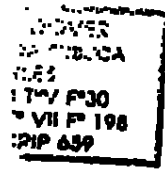
15. El método acorde con la cláusula 9, donde dicho paso de manipulación comprende el suministro a dicho biorreactor de dicho sustrato gaseoso que comprende el gas reductor monóxido de carbono a una velocidad de 0,3 a 2 mmol de CO/gramo de células bacterianas secas en dicho biorreactor/minuto.--



16. El método acorde con la cláusula 15, donde dicha cantidad de CO presente en dicho biorreactor es mayor que la cantidad requerida para mantener dichas bacterias a una concentración bacteriana estable que utilizaría por completo el CO suministrado. _____
17. El método acorde con la cláusula 15, donde dicha cantidad de CO presente en dicho biorreactor mantiene la producción de etanol antes que la producción de acetato. _____
18. El método acorde con la cláusula 15, donde dicha velocidad se encuentra en el rango de 0,5 a 1,5 mmol de CO/gramo de células bacterianas secas en dicho biorreactor/minuto. _____
19. El método acorde con la cláusula 15, donde dicho sustrato gaseoso además comprende un exceso de gas reductor hidrógeno con respecto a dicho monóxido de carbono, donde dicho exceso de hidrógeno causa que dichas bacterias produzcan una relación alta de etanol a acetato en dicho caldo de fermentación. _____
20. El método acorde con la cláusula 9, donde dicho paso de manipulación comprende la alimentación en dicho biorreactor de fermentación de dicho medio de nutrientes que comprende una cantidad de pantotenato de calcio en un rango de 0,5 a 50 µg/gramo de células bacterianas secas producidas en dicho biorreactor. _____
21. El método acorde con la cláusula 20, donde dicha cantidad de pantotenato de calcio es menor que la requerida para mantener dichas bacterias a una concentración bacteriana estable que utilizaría por completo el pantotenato de calcio suministrado. _____

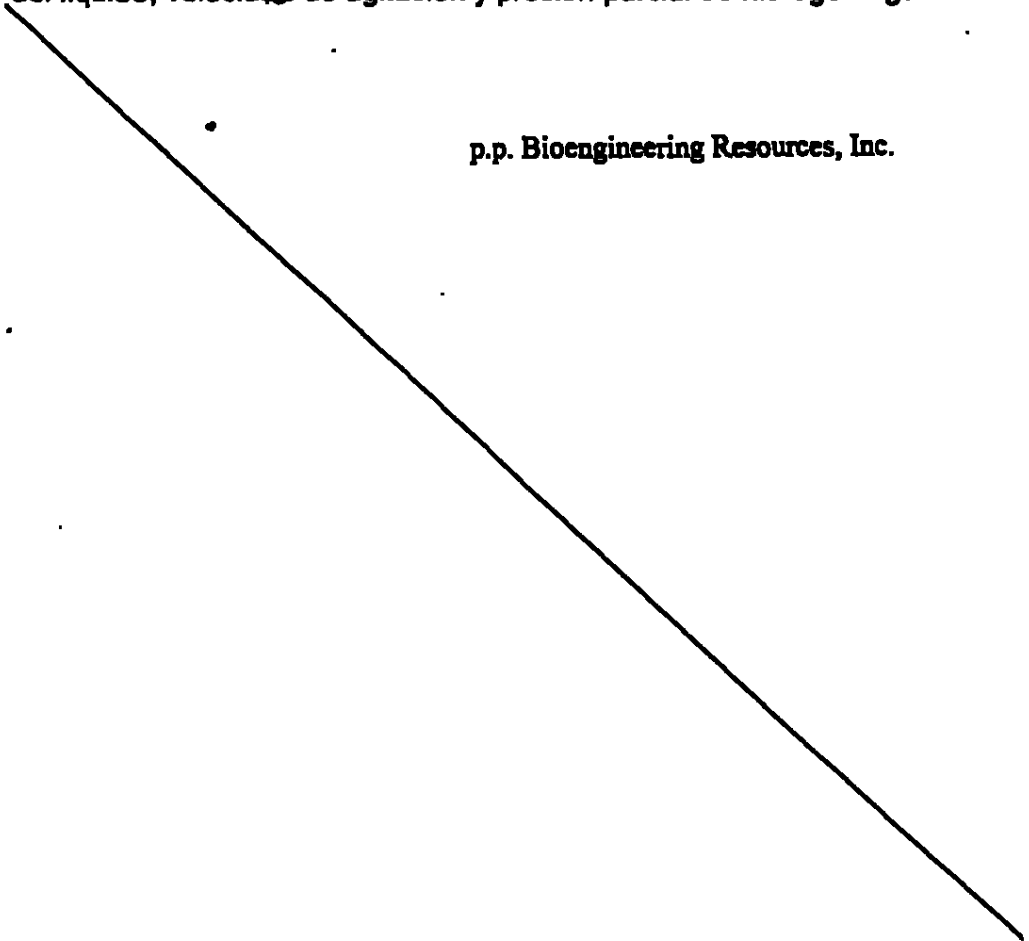


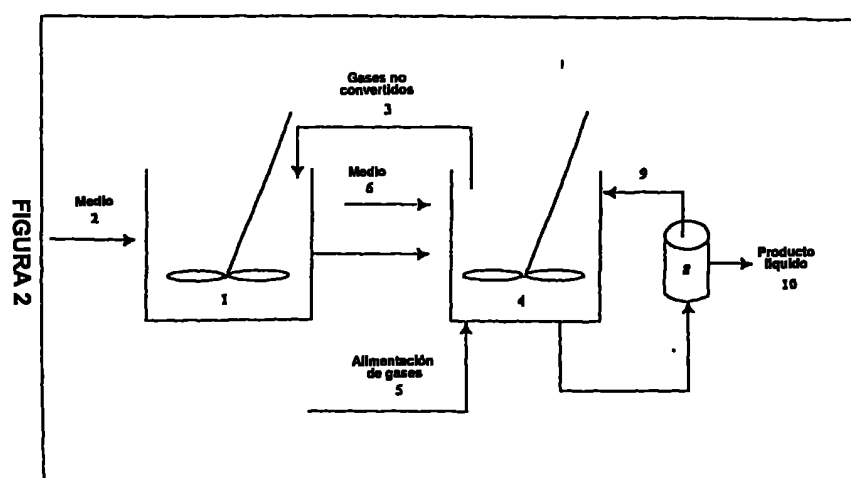
22. El método acorde con la cláusula 20, donde dicha cantidad de pantotenato de calcio mantiene la producción de etanol preferentemente a la producción de acetato. _____
23. El método acorde con la cláusula 20, donde dicha cantidad es de 1 a 25 µg de pantotenato de calcio/gramo de células bacterianas secas producidas. —
24. El método acorde con la cláusula 20, donde dicha cantidad es de 2 a 25 µg de pantotenato de calcio/gramo de células bacterianas secas producidas. —
25. El método acorde con la cláusula 20, que además comprende el paso de prevenir la adaptación de dichas bacterias en dicho biorreactor a dicha cantidad de pantotenato de calcio manteniendo una concentración constante de pantotenato de calcio y ajustando los parámetros seleccionados del grupo formado por velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación y presión parcial de hidrógeno gaseoso. _____
26. El método acorde con la cláusula 20, que además comprende el suministro de un exceso de gas reductor hidrógeno a dicho biorreactor antes de suministrar dicha cantidad de pantotenato de calcio. _____
27. El método acorde con la cláusula 9, donde dicho paso de manipulación comprende la alimentación en dicho biorreactor de fermentación de dicho medio de nutrientes que comprende una cantidad de cobalto en un rango de 5 a 100 µg de cobalto/gramo de células bacterianas secas producidas en dicho biorreactor. _____
28. El método acorde con la cláusula 27, donde dicha cantidad de cobalto es menor que la requerida para mantener dichas bacterias a una concentración bacteriana estable que utilizaría por completo el cobalto suministrado. _____



- 29. El método acorde con la cláusula 27, donde dicha cantidad de cobalto mantiene una producción preferencial de etanol antes que de acetato. ———
- 30. El método acorde con la cláusula 27, donde dicha cantidad es de 20 a 50 µg de pantotenato de calcio/gramo de células bacterianas secas producidas.
- 31. El método acorde con la cláusula 27, que además comprende el paso de prevenir la adaptación de dichas bacterias en dicho biorreactor a dicha cantidad de cobalto manteniendo la concentración de cobalto constante y ajustando los parámetros seleccionados del grupo formado por velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación y presión parcial de hidrógeno gaseoso. ———

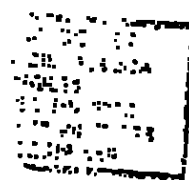
p.p. Bioengineering Resources, Inc.





100-443886-1

~~15~~



MÉTODOS PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DEL ETANOL DE UNA FERMENTACIÓN MICROBIANA

RESUMEN

Un método estable y continuo para producir etanol a partir de la fermentación bacteriana anaeróbica de un sustrato gaseoso que contiene al menos un gas reductor. Dicha fermentación incluye cultivar bacterias acetogénicas anaeróbicas en un biorreactor de fermentación con un medio nutriente líquido; proporcionar el sustrato gaseoso al biorreactor; y manipular las bacterias en el mismo reduciendo el potencial redox, o aumentando la proporción de NAD(P)H respecto de NAD(P) en el caldo de fermentación, después de que las bacterias alcancen un estado estacionario y una concentración estable de células en el biorreactor. La concentración de ácido acético libre en el biorreactor se mantiene en menos de 5 g/l de ácido libre. Dicho método permite la producción de etanol en el caldo de fermentación en el biorreactor a una productividad mayor de 10 g/l diarios. Se produce tanto etanol como acetato en una proporción de etanol a acetato dentro del rango de 1:1 y 20:1.

125

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
☒ PATENTE DE INVENCION	()	()
☒ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de 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	()	()

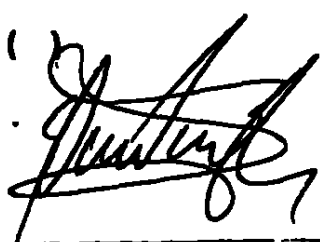
COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha: Radicación : 83002550 00000000 Folios: 124

Fecha (MD): 2013-01-16 16:01:59

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES