

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 363**

51 Int. Cl.:
C12P 7/46 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C07C 51/43 (2006.01)
C07C 51/41 (2006.01)
C07C 51/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08865165 .8**
96 Fecha de presentación: **15.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2265723**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

54 Título: **Procedimientos de producción de ácido succínico**

30 Prioridad:
13.12.2007 FR 0759827
18.02.2008 FR 0851028

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
ROQUETTE FRERES (100.0%)
62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:
DEHAY, FRÉDÉRIC;
SEGUEILHA, LAURENT;
CALANDE, OLIVIER y
VARLAMOFF, CAROLINE

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 363 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de producción de ácido succínico

La presente invención se refiere a procedimientos de producción de ácido succínico y/o de iones succinato mediante fermentación en condiciones anaerobias.

5 El ácido succínico (o ácido butanodioico) es un ácido orgánico con dos grupos carboxilos, de fórmula semi-desarrollada $\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, que interviene en el metabolismo celular, como intermediario metabólico del ciclo de Krebs en la mitocondria.

10 Se encuentra en numerosas aplicaciones en los campos cosméticos, agroalimentarios, farmacéuticos, textiles y en los plásticos. Así, se utiliza por ejemplo como intermediario de síntesis de los plásticos para la fabricación de 1,4-butanodiol, de tetrahidrofurano y de gamma-butirolactona.

Nuevos productos derivados del ácido succínico están en constante desarrollo, incluyendo el desarrollo de poliésteres.

Generalmente, los ésteres del ácido succínico tienen el potencial de ser nuevos disolventes "verdes" que pueden sustituir los disolventes más perjudiciales para el ser humano y el medioambiente.

15 La producción de ácidos carboxílicos, tales como el ácido málico, el ácido succínico o el ácido fumárico, a partir de materias primas renovables (en este caso a través de los procesos de fermentación) es conocida por el experto en la materia.

20 El succinato es un intermediario metabólico durante la fermentación anaerobia por unas bacterias que producen propionato, pero estos procedimientos de fermentación resultan de la producción de muy bajos rendimientos y títulos de ácido succínico.

Estos últimos años, muchos microorganismos productores de ácido succínico han sido aislados, como por ejemplo las bacterias anaerobias de la panza, *Bacteroides rumenicola* y *Bacteroides amylophilus*. Sin embargo, los organismos de la panza son muy inestables durante los procedimientos de fermentaciones, y no son por lo tanto utilizables de manera industrial para la producción de ácido succínico.

25 Se sabe desde hace mucho tiempo que una mezcla de varios ácidos, entre ellos el ácido succínico, es producida a partir de la fermentación de *E. coli* en presencia de glucosa y de CO_2 como sustratos carbonados, como se describe por JL Stokes en 1949 «Fermentation of glucose by suspensions of *Escherichia coli*» J. Bacteriol., 57; 147-158. Sin embargo, por cada mol de glucosa fermentada, se producen sólo de 0,3 a 0,4 moles de ácido succínico. Se realizaron por lo tanto unos estudios sobre unas bacterias, en particular *Escherichia coli*, modificadas genéticamente a fin de inactivar las vías metabólicas que consumen el NADH necesario para la fabricación del ácido succínico y a fin de activar las vías metabólicas de producción del succinato (sal del ácido succínico).

En efecto, el camino metabólico fermentario que permite la conversión del oxaloacetato en malato, después en fumarato, y finalmente en succinato necesita dos moles de NADH por mol de succinato producido. El mayor bloqueo metabólico para la producción de succinato es por lo tanto la biodisponibilidad celular en NADH.

35 Para solucionar esta dificultad, el documento US 7.223.567 describe la utilización de una cepa de *Escherichia coli*, recombinante superproductora de succinato para la misma cantidad de NADH disponible.

40 Esta cepa de *Escherichia coli*, SBS550 MG pH1 413 presenta una inactivación de los productos de los genes *adhE*, *ldhA* (implicados en las vías consumidoras de NADH), y una inactivación de los productos de los genes *ack-pta* y del gen *iclR* (que activa la vía glioxilato), y contiene un vector plasmídico que sobreexpresa un gen *PYC* exógeno. El artículo de Sanchez *et al.* (titulado «Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity» en *Metabolic Engineering* 7 (2005) 229-239), la patente Americana US 7 223 567 y la solicitud de patente Americana US 2005/0042736 han desarrollado nuevas condiciones de cultivo y de producción asociadas a esta cepa para mejorar sus rendimientos de producción en ácido succínico.

45 El experto en la materia investiga constantemente nuevos procedimientos mejorados de producción de ácido succínico. En particular, el experto en la materia busca optimizar el rendimiento y la productividad obtenidos. Por otra parte, los métodos de fermentación clásicos conducen a importantes emisiones de dióxido de carbono en la atmósfera, lo que es muy evidentemente poco deseable.

50 Según un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de ácido succínico y/o de iones succinato mediante fermentación anaerobia de una cepa de *Escherichia coli*, que comprende:

(A) una etapa de fermentación de una fuente de carbono en un fermentador, con aporte de CO_2 , realizada con los conductos de ventilación del fermentador cerrados de manera que el aporte de CO_2 esté sometida al consumo de CO_2 por la cepa; seguida, antes del agotamiento total de la fuente de carbono, de

(B) una etapa de fermentación de la fuente de carbono restante, sin aporte de CO₂, a fin de consumir el CO₂ residual.

5 El experto en la materia está familiarizado con las técnicas de fermentación (tales como la particularmente descrita en Fermentation & Biochemical Engineering Handbook: principios, process design & equipment, 2ª ed. 1996 de VOGEL Henry C. y TODARO Celeste L.).

La fermentación es una reacción bioquímica que consiste generalmente en liberar energía, o en producir ciertos metabolitos de interés a partir de un sustrato orgánico bajo la acción de enzimas microbianas.

10 La fermentación se lleva a cabo generalmente en unos dispositivos (fermentadores) adaptados al proceso de fermentación, es decir adaptados al cultivo de microorganismos en las condiciones deseadas (dispositivo que permite, llegado el caso, controlar los equilibrios gaseosos del medio de cultivo, en particular por unos conductos de entrada y/o de salida de gas, conductos de ventilación, etc.; dispositivos que permiten la introducción de medio de cultivo y otras sustancias; dispositivos que permiten controlar, regular, o modificar otros tipos de parámetros, tales como la agitación, la temperatura, el pH, etc.).

15 El experto en la materia está también familiarizado con la fermentación en condiciones anaerobias. Según la presente invención, esto designa unas condiciones de cultivo en ausencia de oxígeno. De manera preferida, unas condiciones de cultivo anaerobias son unas condiciones de cultivo en presencia de dióxido de carbono. Según un modo de realización, las condiciones de fermentación anaerobias en presencia de CO₂ y/o con aporte de CO₂ son unas condiciones de fermentación en saturación de CO₂.

20 Por "antes del agotamiento total de la fuente de carbono" durante la etapa (A), se entiende un instante de la etapa (A) en el que el medio de fermentación contiene una cantidad residual de fuente de carbono que puede ser integralmente transformada por la cepa de ácido succínico y/o de succinato gracias al CO₂ disponible en disolución en este instante (en forma de CO₂, disuelto o de HCO₃⁻).

25 Durante la etapa (A), estando cerrado(s) el o los conductos de ventilación del fermentador y siendo la alimentación en CO₂ del fermentador mantenida, el aporte de CO₂ se realiza de manera discontinua, automáticamente ajustado en función del consumo de CO₂ por la cepa para la producción de ácido succínico y/o de succinato.

30 Por "automáticamente ajustado" se entiende, teniendo en cuenta el equilibrio termodinámico entre la fase líquida (medio de fermentación) y la fase gaseosa ("atmósfera") presentes en el fermentador (conducto(s) de ventilación cerrado(s)), que el aporte de una cantidad dada de CO₂ puede intervenir sólo después del consumo de una cantidad equivalente por la cepa por fermentación (y por lo tanto la producción concomitante de ácido succínico y/o de succinato).

Durante la etapa (B), no hay aporte de CO₂, lo que significa que el aporte de CO₂ realizado durante la etapa (A) es interrumpido. Esto se puede realizar en particular mediante corte en la alimentación de CO₂.

Ventajosamente, según la invención, la fermentación durante la etapa (B) consume el CO₂ (residual disuelto) y los iones HCO₃⁻ presentes en el medio de fermentación.

35 Según un modo preferido de realización, antes del principio de la etapa (A), el aporte de CO₂ se realiza mediante inyección, con los conductos de ventilación del fermentador abiertos, a fin de alcanzar la saturación del medio de fermentación en CO₂.

A título de ejemplo, el CO₂ se puede introducir mediante inyección a un caudal de 0,15-0,40 vvm (volumen de CO₂ por volumen de cultivo por minuto), preferiblemente 0,3 vvm.

40 Por "medio de fermentación saturado de CO₂" se entiende el hecho de que el medio de cultivo contenga la cantidad máxima de CO₂ que puede ser disuelta en las condiciones correspondientes (temperatura, pH, etc.). Por ejemplo, esto puede corresponder a una concentración de 1-2 g/l, por ejemplo del orden de 1,5 g/l a 37°C, pH 7.

Según un modo de realización, la etapa (A) se desarrolla con un pH en un intervalo de 6,0-7,0, preferiblemente 6,4-6,8, preferiblemente 6,5-6,6.

45 Según un modo de realización, la fuente de carbono es la glucosa.

Según un modo de realización, al principio de la etapa (A), el medio de fermentación comprende 15-40 g/l, preferiblemente 15-25 g/l, preferiblemente 15-20 g/l de glucosa. Según un modo de realización, al principio de la etapa (B), el medio de fermentación comprende 2-6 g/l, preferiblemente alrededor de 4 g/l de glucosa.

50 Según un modo de realización preferido, la cepa de *Escherichia coli* es una cepa que posee el genotipo $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ackpta$ PYC. Este genotipo permite ventajosamente favorecer la producción de ácido succínico mediante fermentación en presencia de CO₂. El símbolo Δ indica que el gen en cuestión se ha inactivado, por ejemplo mediante mutación, delección, interrupción, inserción o "down"-regulación, por ejemplo mediante introducción de un codón stop, inserción o delección que resulta de un cambio de cuadro de lectura, mutación puntual, etc.

El genotipo $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ackpta$ PYC corresponde por lo tanto a:

- $\Delta adhE$: inactivación del alcohol deshidrogenasa;
- $\Delta ldhA$: inactivación de la lactato-deshidrogenasa;
- $\Delta iclR$: inactivación de la isocitrato-liasas (también conocida con el nombre de aceA)

5 - $\Delta ackpta$: inactivación de la acetato-quinasa-fosfotransacetilasa;

- PYC: expresión de un gen de piruvato carboxilasa. Este indica que la cepa expresa el gen PYC, por ejemplo gracias a una transformación por un plásmido que lleva un ejemplar funcional de este gen, o mediante integración genómica de un ejemplar funcional de PYC. El gen PYC es ventajosamente el gen *pyc* de *Lactococcus lactis*.

10 Según un modo de realización muy preferido, la cepa de *Escherichia coli* es la cepa SBS550MG - pHL413. Esta cepa se describe en Sanchez *et al.*, *Metabolic Engineering*, 7 (2005) 229-239, y en los documentos US 7,223,567 y US 2005/0042736.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de ácido succínico que comprende:

- 15 - un procedimiento de producción de ácido succínico y/o de iones succinato tal como el descrito anteriormente;
- llegado el caso, una etapa de acidificación de los iones succinato en ácido succínico (por ejemplo mediante adición de ácido fuerte en el mosto,
- 20 - una etapa de purificación del ácido succínico; y opcionalmente una etapa de cristalización del ácido succínico.

Según un modo de realización, en todos los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de purificación comprende una purificación etanólica que se desarrolla de esta manera:

- filtración (eliminación de un precipitado proteico), por ejemplo sobre Büchner y/o sobre tierra de filtración del mosto acidificado,
- 25 - opcionalmente, concentración del filtrado mediante evaporación al vacío (preferiblemente, siguiendo un factor de concentración entre aproximadamente 2 y 8),
- adición de etanol, por ejemplo etanol al 95%, en una relación 1/1 a 5/1, para provocar la precipitación de las sales (el ácido succínico sigue soluble),
- separación del precipitado salino mediante filtración, por ejemplo sobre una membrana,
- 30 - recuperación del etanol por evaporación al vacío,
- tratamiento sobre carbón activo, y después filtración sobre placa y tierra de filtración.

La invención se ilustra mediante los ejemplos de realización siguientes, que no son limitativos.

Ejemplos

35 **Ejemplo 1: Producción de ácido succínico por fermentación anaerobia según dos modos diferentes de aporte del CO₂ con el conducto de ventilación del fermentador abierto o cerrado.**

El procedimiento de producción de ácido succínico comprende:

- 40 - una fase de precultivo en Erlenmeyer,
- una fase de cultivo en condiciones aerobias en un medio de cultivo que comprende la maceración de maíz como fuente de nitrógeno y de glucosa como fuente de carbono, permitiendo esta fase la producción de biomasa, y
- una fase anaerobia que permite la producción propiamente dicha de ácido succínico. Las fases en condiciones aerobia y anaerobia son realizadas en un mismo fermentador. La cepa utilizada es la cepa SBS550MG-pHL413.

Fase aerobia:

ES 2 391 363 T3

La cepa SBS550MG-pHL413 se precultiva en Erlenmeyer durante 17h a 37°C, bajo agitación a 125 rpm. 400 ml de medio son inoculados por la cepa en un Erlenmeyer de 2 litros con 2 deflectores.

La composición de este medio de precultivo es la siguiente:

Tryptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Antibióticos (ampicilina, carbenicilina, oxacilina)	67 mg/l

- 5 La cepa así precultivada se coloca en un fermentador de 15L en un medio de cultivo cuya composición es la siguiente:

Glucosa: 2 g/l de partida + 2 g/l cuando los primeros 2 g/l son consumidos	
Maceración de maíz: 60 g/l	
Sales y antibióticos:	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25
K ₂ HPO ₄	0,7
KH ₂ PO ₄	1,2
KCl	2
CaCl ₂	0,2
MgSO ₄	0,25
Ampicilina	0,067
Biotina Tiamina	0,001

El inóculo obtenido por precultivo en Erlenmeyer representa el 3% del volumen total del medio cultivado en el fermentador.

- 10 Las condiciones de cultivo durante la fase aerobia son una temperatura de 37°C, una agitación de 500 rpm, una aeración de 1 vvm y ninguna regulación de pH (el pH está simplemente ajustado a 7,5 antes de la esterilización del medio).

Fase anaerobia:

- Protocolo con aporte continuo de CO₂

- 15 - se añade en el medio: glucosa: 20 g/l de partida + 15 g/l a 24h + 4 g/l a 50h.

- la fermentación se realiza a pH 6,4 con una inyección continua de CO₂ a un caudal de 03 vvm (L/L/min), a 37°C, con el conducto de ventilación del fermentador abierto, bajo agitación a 250 rpm.

- se termina en 63,5 h con un título final de ácido succínico de 30 g/l en el medio de cultivo.

- la cantidad global de CO₂ consumido se establece a (0,3 vvm x 60 min. x 63,3 h / 22,4 mol/L x 44 g/mol) 2245 g/l, es decir 73 g/g de ácido succínico formado.

- 20

- Por otra parte, una concentración de 2 g/l de HCO₃ (que corresponde a 1,5 g/l de CO₂) está presente al final de la fermentación en el medio de cultivo.

- Protocolo según la invención

El protocolo de fermentación es idéntico al anterior, excepto que

- al principio de la fase anaerobia, se introduce CO₂ en el fermentador a un caudal de 0,3 vvm durante 1 minuto, a fin de expulsar el aire residual procedente de la fase aerobia,
- la presión de la red de CO₂ está reducida a 0,4 bares,
- el conducto de ventilación del fermentador está cerrado herméticamente, a fin de impedir la salida del CO₂,
- así, la inyección de CO₂ está precisamente ajustada a su consumo a lo largo de la fermentación,
- la inyección de CO₂ se corta cuando la concentración residual en glucosa alcanza 4 g/l a fin de consumir el HCO₃⁻ residual disuelto en el medio.

Resultados según la invención:

- concentración final en ácido succínico producido en el medio de cultivo al final de la fermentación: 30 g/l, lo que es idéntico a la concentración obtenida con aporte continuo de CO₂,
- concentración de HCO₃⁻ residual en el medio de cultivo al final de la fermentación: 0,3 g/l (lo que representa una reducción del 85% con respecto a la concentración obtenida con aporte continuo de CO₂),
- consumo de CO₂: 0,59 g/l al principio + 6 g/l fijado sobre el succínico, es decir 0,2 g/g de ácido (lo que representa una reducción del 99,7% con respecto a la concentración obtenida con aporte continuo de CO₂).

Así, ventajosamente, según la invención, manteniendo al mismo tiempo el rendimiento de producción de ácido succínico, se evitan emisiones importantes de dióxido de carbono:

- el hecho de trabajar en un reactor cerrado limita naturalmente las emisiones, y
- por otra parte, se observa una disminución de la concentración en HCO₃⁻ residual en el medio de cultivo al final de la fermentación. Ahora bien, la acidificación del HCO₃⁻ residual en el medio de cultivo al final de la fermentación conduce a una liberación de CO₂.

Ejemplo 2: Obtención de ácido succínico por fermentación anaerobia, purificación etanólica y cristalización

El procedimiento de producción de ácido succínico del Ejemplo 1 (con NaOH como agente de regulación del pH) está seguido de una etapa de purificación etanólica como la descrita a continuación:

- centrifugación del medio de fermentación (mosto) (5000 g, 15 minutos, 20°C) (eliminación de la biomasa),
- adición de ácido sulfúrico al 95% al sobrenadante hasta la obtención de un pH de 1,5,
- filtración del mosto sobre Büchner con placa SEITZ EK y tierra de filtración FW20 (eliminación de un precipitado proteico),
- concentración del filtrado por evaporación al vacío (el factor de concentración oscila entre aproximadamente 2 y 8),
- adición de etanol al 95%, 2 volúmenes de etanol por 1 volumen del filtrado concentrado para provocar la precipitación de las sales (el ácido succínico sigue soluble),
- separación del precipitado salino por filtración sobre una membrana millipore de 3 micrones,
- recuperación del etanol mediante evaporación al vacío,
- tratamiento del carbón activo (2%/s de PUREFLOW C- 80°C- durante 1 hora) y después filtración sobre placa SEITZ EK y tierra de filtración FW20,
- evapocristalización (Temperatura del baño maría de 75°C - presión residual de 60 mbares MS masa cocida aproximadamente 50%),
- enfriamiento de la masa cocida bajo agitación a 20°C,
- separación de los cristales mediante filtración sobre una membrana millipore de 3 micrones,
- aclarado de los cristales con agua desmineralizada,
- secado de los cristales durante una noche a 60°C al vacío.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de ácido succínico y/o de iones succinato por fermentación en condiciones anaerobias de una cepa de *Escherichia coli*, que comprende:
- 5 (A) una etapa de fermentación de una fuente de carbono en un fermentador, con aporte de CO₂, realizada con los conductos de ventilación del fermentador cerrados de manera que el aporte de CO₂ esté sometido al consumo de CO₂ por la cepa; seguida, antes del agotamiento total de la fuente de carbono, de
- (B) una etapa de fermentación de la fuente de carbono restante, sin aporte de CO₂, a fin de consumir el CO₂ residual.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, al principio de la etapa (A), el medio de fermentación está saturado de CO₂.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la etapa (A) y/o la etapa (B) se desarrolla a un pH en un intervalo de 6,0-7,0.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la etapa (A) y/o la etapa (B) se desarrolla a un pH de 6,4-6,8.
- 15 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fuente de carbono es la glucosa, y en el que:
- al principio de la etapa (A), el medio de fermentación comprende 15-40 g/l de glucosa, y
 - al principio de la etapa (B), el medio de fermentación comprende 2-6 g/l de glucosa.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la cepa de *Escherichia coli* posee el genotipo $\Delta adhE \Delta ldh4 \Delta iclR \Delta ackpta$ PYC.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la cepa de *Escherichia coli* es la cepa SBS550MG - pH413.
8. Procedimiento de obtención de un ácido succínico, que comprende:
- 25 - un procedimiento de producción de ácido succínico y/o de iones succinato según cualquiera de las reivindicaciones 1-7;
- llegado el caso, una acidificación de los iones succinato en ácido succínico; y
 - una etapa de purificación del ácido succínico; y
 - opcionalmente, una etapa de cristalización del ácido succínico.
- 30 9. Procedimiento de obtención de ácido succínico según la reivindicación 8, caracterizado porque la etapa de purificación del ácido succínico es una purificación etanólica.