

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 623**

51 Int. Cl.:

C07C 31/18 (2006.01)

C07C 33/02 (2006.01)

C07C 29/76 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2010 PCT/US2010/037329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10141780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2010 E 10784131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2438036**

54 Título: **Procedimiento de separación de componentes de un caldo de fermentación**

30 Prioridad:

04.06.2009 US 184292 P

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**GENOMATICA, INC. (100.0%)
10520 Wateridge Circle
San Diego, CA 92121**

72 Inventor/es:

**CLARK, WARREN;
JAPS, MICHAEL y
BURK, MARK, J.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 625 623 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

Procedimiento de separación de componentes de un caldo de fermentación

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere en general a la separación de componentes de un caldo de fermentación y, más específicamente al aislamiento de compuestos miscibles con agua que tienen puntos de ebullición mayores que el agua a partir de otros componentes del caldo de fermentación.

10 Existen incentivos medioambientales y de reducción de costes para diseñar esquemas de procedimientos que tienen la capacidad de separar y opcionalmente recircular componentes en una fermentación incluyendo la masa celular, medios residuales y sales de medios, sustrato residual tal como sacarosa y/o glucosa y agua. También se han hecho esfuerzos para recircular la masa celular como un medio para mejorar la productividad de la fermentación. Se ha hecho menos esfuerzo en el área de la recuperación de los medios residuales y sales de medios para su reutilización en la fermentación. En este sentido, la mayoría de los esfuerzos se han centrado en reducir los costes iniciales de los medios, en lugar de la recuperación posterior. Los medios de "bajo coste" resultantes a menudo no son óptimos para el crecimiento celular y la producción de productos. Mediante el desarrollo de métodos eficaces para la recuperación de componentes de medios, se puede utilizar una receta de medios más óptima con menos restricciones sobre los costes iniciales de la materia prima.

25 El aislamiento de compuestos a gran escala con pureza útil es un desafío complejo en la química del proceso. Las diferencias de escala por sí solas pueden hacer que los procedimientos de aislamiento desarrollados a escala de laboratorio sean poco prácticos o incluso no viables a escala piloto o comercial. El aislamiento de compuestos a partir de mezclas complejas depende de numerosos factores incluyendo si el compuesto es un sólido o líquido a temperaturas ambientales, el punto de ebullición de los compuestos, la densidad, la polaridad, la presencia o ausencia de grupos funcionales sensibles al pH y la solubilidad en disolventes orgánicos frente a agua. Estos factores también se aplican a todos los demás componentes de la mezcla a partir de la cual se va a aislar el compuesto de interés. Otra propiedad que influye en el aislamiento de un compuesto, en particular compuestos orgánicos, es cómo se divide entre dos fases inmiscibles, tales como entre agua y un disolvente orgánico. Los compuestos que son particularmente polares a menudo son más solubles en agua que en los disolventes orgánicos comunes usados en los procedimientos de extracción. Algunos compuestos son particularmente difíciles de aislar del agua mediante métodos extractivos debido a su carácter anfífilo. Los anfífilos son compuestos que poseen tanto una porción polar como una porción lipófila. Estos compuestos pueden complicar el aislamiento mediante extracción al producir emulsiones intratables.

40 Además, cuando se prepara un compuesto a partir de una fermentación, la cantidad de agua puede ser sustancialmente mayor que el compuesto de interés, requiriendo el aislamiento de un componente minoritario a partir de una mezcla compleja. El aislamiento de compuestos que hierven a una temperatura mayor que el agua contribuye adicionalmente a la complejidad y al coste de la separación ya que el compuesto no puede destilarse directamente a partir del caldo de fermentación como es el caso, por ejemplo, en un procedimiento de fermentación de etanol. En este sentido, las interacciones entre el compuesto de interés y el agua pueden hacer que las dos entidades destilen conjuntamente como un azeótropo a un punto de ebullición diferente de los dos componentes purificados. La formación de un azeótropo no es fácilmente predecible. Esto puede disminuir la recuperación del compuesto de interés cuando se intenta separar el mismo del agua. Cuando un compuesto tiene grupos funcionales polares, otra preocupación es cómo puede interactuar con otros compuestos presentes en la fase acuosa, incluyendo cualquier sal e iones metálicos, por ejemplo.

50 La naturaleza de los grupos funcionales presentes en un compuesto de interés puede complicar la separación de sales. Por ejemplo, uno o más grupos funcionales de un compuesto pueden interactuar con o quelar cationes o aniones. La quelación tiene lugar de una manera dependiente del tamaño con respecto al catión o anión y también dependiente de la disposición de los grupos funcionales en el compuesto de interés. La quelación y otras interacciones pueden hacer que algunas sales sean solubles en un compuesto líquido incluso en ausencia de agua, mientras que otras sales pueden ser insolubles en ausencia de agua a pesar de la presencia de un compuesto con grupos funcionales capaces de interactuar con sales. Estos tipos de efectos sobre la solubilidad de sal son difíciles de predecir. Contribuyendo además a la complejidad de la interacción entre un compuesto y sales, está la naturaleza de cualquier codisolvente. Por ejemplo, durante el aislamiento de un compuesto de interés que es miscible con agua, el enlace de hidrógeno y otras interacciones con el agua pueden interrumpir la interacción entre las sales y el compuesto de interés. Por tanto en algunos casos, puede separarse una sal más fácilmente de un compuesto en presencia de cierta cantidad de agua. Sin embargo, es difícil predecir la cantidad de agua que equilibra la sobresaturación de sal permitiendo la separación de sales mediante cristalización, por ejemplo, mientras se mantiene la capacidad del agua para interrumpir la quelación y otras interacciones entre un compuesto de interés y cualquier sal.

65 Aún otro desafío en el desarrollo de métodos de aislamiento es la reactividad potencial de subproductos biosintéticos tales como ácidos orgánicos, sustrato en exceso y similares. En condiciones de calentamiento, el sustrato en exceso

puede degradarse y provocar una coloración indeseable del producto. Además, algunos subproductos pueden reaccionar con el producto de interés, reduciendo eficazmente los rendimientos de aislamiento. Estos subproductos pueden incluir los formados durante la fermentación así como los subproductos formados durante las etapas del propio procedimiento de aislamiento, por ejemplo, debido a procesos de degradación a temperaturas elevadas durante una destilación, evaporación de agua y similares.

El documento US 6.361.983 B1 se refiere al procedimiento para el aislamiento de 1,3-propanodiol a partir de caldo de fermentación, y el documento DE 10 2005 042 541 se refiere a la producción de productos metabólicos microbianos no volátiles en forma sólida mediante fermentación.

Por tanto, existe una necesidad de desarrollar procedimientos que permitan el aislamiento de compuestos miscibles con agua que tienen puntos de ebullición mayores que el agua a partir de fermentaciones microbianas, mientras se tiene en cuenta el beneficio medioambiental y de coste de recircular otros componentes de fermentación. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La invención se refiere a procedimientos de aislamiento de 1,4-butanodiol (1,4-BDO) a partir de un caldo de fermentación que incluyen separar una fracción líquida enriquecida en 1,4-BDO de una fracción sólida que comprende células en los que dicha etapa de separar dicha fracción líquida de dicha fracción sólida comprende ultrafiltración, retirar agua de dicha fracción líquida, retirar sales de dicha fracción líquida, en los que las sales se retiran mediante nanofiltración y mediante intercambio iónico antes de la retirada de agua, y purificar 1,4-BDO.

Se divulga en el presente documento un procedimiento de aislamiento de 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación que incluye retirar una porción de sólidos mediante centrifugación por discos para proporcionar una fracción líquida, retirar una porción adicional de sólidos de la fracción líquida mediante ultrafiltración, retirar una porción de sales de la fracción líquida mediante cristalización por evaporación, retirar una porción adicional de sales de la fracción líquida mediante intercambio iónico, y destilar 1,4-BDO.

Todavía en otros aspectos, las realizaciones divulgadas en el presente documento se refieren a un procedimiento de aislamiento de 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación que incluye retirar una porción de sólidos mediante centrifugación por discos para proporcionar una fracción líquida, retirar una porción adicional de sólidos de la fracción líquida mediante ultrafiltración, retirar una porción de sales de la fracción líquida mediante nanofiltración, retirar una porción adicional de sales de la fracción líquida mediante intercambio iónico, evaporar una porción de agua, y destilar 1,4-BDO.

Todavía en otros aspectos, las realizaciones divulgadas en el presente documento se refieren a un procedimiento para producir 1,4-BDO que incluye cultivar un microorganismo que produce 1,4-BDO en un fermentador durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-BDO. El microorganismo que produce 1,4-BDO incluye un microorganismo que tiene una ruta de 1,4-BDO incluyendo uno o más genes exógenos que codifican una enzima de la ruta de 1,4-DBO y/o una o más inactivaciones génicas. El procedimiento incluye además aislar 1,4-BDO según los procedimientos de aislamiento descritos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama de bloques de etapas en el procedimiento de purificar 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación.

La figura 2 muestra una vista en sección transversal de una centrífuga de pilas de discos centrífuga de pilas de discos.

La figura 3 muestra una vista en sección transversal de una centrífuga decantadora.

La figura 4 muestra un diagrama de un cristalizador de circulación forzada.

La figura 5 muestra un diagrama de un cristalizador de circulación forzada con un intercambiador de calor horizontal y deflectores en el volumen activo.

La figura 6 muestra un diagrama de un cristalizador de tubo de aspiración y deflector.

La figura 7 muestra un diagrama de un cristalizador de circulación inducida.

La figura 8 muestra un diagrama de un cristalizador Oslo de tipo cerrado.

La figura 9 muestra un diagrama de un cristalizador Oslo de tipo abierto.

La figura 10 muestra una vista en sección transversal parcial de un evaporador de película descendente.

La figura 11 muestra una vista en sección transversal parcial de un evaporador de circulación forzada.

5 La figura 12 muestra una vista en sección transversal parcial de un evaporador de placa.

La figura 13 muestra un diagrama de un evaporador de circulación.

10 La figura 14 muestra un diagrama de un evaporador de lecho fluidizado.

La figura 15 muestra un diagrama de flujo de un esquema completo para la producción y el aislamiento de 1,4-BDO.

15 La figura 16 muestra un diagrama de flujo de otro esquema completo para la producción y el aislamiento de 1,4-BDO.

Descripción detallada de la invención

20 La producción por fermentación de productos químicos básicos es una alternativa útil a la producción tradicional usando materias primas no renovables de combustibles fósiles. Con la capacidad de utilizar materias primas renovables tales como biomasa reciclada y similares, el procedimiento puede resultar más económico y ecológico que la producción basada en combustibles fósiles. Los productos generados a partir de la fermentación pueden ser útiles en muchas aplicaciones. La presente invención proporciona métodos para la producción de 1,4-BDO. El 1,4-butanodiol (BDO) es un producto intermedio para polímeros y un disolvente industrial. Posteriormente, el butanodiol puede transformarse adicionalmente; por ejemplo, mediante oxidación a gamma-butirolactona, que puede convertirse adicionalmente en pirrolidona y N-metil-pirrolidona, o puede someterse a hidrogenolisis para dar tetrahidrofurano. Estos compuestos tienen usos variados como productos intermedios para polímeros, disolventes y aditivos.

30 Esta invención se refiere, en parte, a procedimientos para aislar compuestos miscibles con agua que tienen puntos de ebullición mayores que el agua a partir de una fermentación mientras que permiten opcionalmente la recirculación de otros componentes del caldo de fermentación. El procedimiento separa la masa celular, que puede incluir organismos microbianos que se han diseñado mediante ingeniería genética con inserciones génicas, inactivaciones génicas o una combinación de inserciones e inactivaciones para producir compuestos en rendimientos útiles a partir de una materia prima adecuada.

35 El caldo libre de células, o fracción líquida, se procesa adicionalmente mediante la retirada de sales. Esto puede lograrse mediante varios métodos antes o después de la retirada de algo o sustancialmente toda el agua del caldo de fermentación. Tal como se describió anteriormente, las sales no se recuperan a menudo para recirculación en un procedimiento de fermentación. Habitualmente, cualquier recuperación de sal implica una forma de sal de un producto biosintético deseado tal como lactato, citrato o u otro producto carboxilato o sales de amonio de productos que contienen amina, en lugar de sales de medios y similares. El procedimiento descrito en el presente documento permite la recuperación de sales de medios y la recirculación opcional de nuevo a la fermentación. El procedimiento de aislamiento también implica la retirada de agua, que puede reintroducirse en el sistema de fermentación. En la purificación final, el compuesto producido mediante fermentación puede destilarse, o recristalizarse si es sólido, de la fracción líquida restante tras la retirada de células, sales y agua. En el caso de un líquido, la purificación final puede 45 conseguirse mediante destilación fraccionada, por ejemplo.

50 La invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de un compuesto de interés miscible con agua que tiene un punto de ebullición mayor que el agua a partir de un caldo de fermentación. El procedimiento incluye (1) separar una fracción líquida enriquecida en el compuesto de una fracción sólida que incluye células; (2) retirar agua de la fracción líquida; (3) retirar sales de la fracción líquida, y (4) purificar el compuesto de interés mediante destilación o recristalización. Las etapas (2) y (3) anteriores pueden realizarse en cualquier orden, o juntas.

55 Los compuestos de interés descritos en el presente documento con puntos de ebullición mayores que el agua que son accesibles mediante fermentación pueden tener puntos de ebullición de 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 150°C, 200°C y 300°C mayores que el agua y más, incluyendo todos los valores entre medias. Los compuestos de interés que tienen puntos de ebullición mayores que el agua pueden incluir, por ejemplo, 1,4-BDO, 1,3-BDO, 2,3-BDO, 1,3-PDO, 1,2-PDO (metiletil-glicol), 1,2-etanodiol (etilenglicol), gamma-butirolactona (GBL), 1,5-pentanodiol, 1,6-hexanodiol. Además, los compuestos de interés incluyen los que son miscibles con agua. En algunas realizaciones, tales compuestos miscibles con agua pueden ser recalcitrantes con respecto a procedimientos de extracción convencionales. Adicionalmente, los compuestos de interés incluyen los que son neutros. Tal como se usa en el presente documento, un compuesto neutro se refiere a un compuesto que no posee grupos funcionales capaces de portar carga, tal como aminas, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos borónicos y similares. Finalmente, los compuestos de interés pueden ser lo suficientemente pequeños de modo que son permeables con respecto a una membrana de nanofiltración, tal como se describe adicionalmente a 65 continuación. Las clases de compuesto a modo de ejemplo incluyen alcoholes, dioles, trioles, tales como glicerina, tetraoles, polioles y similares.

- 5 El compuesto de interés según la invención es 1,4-BDO. El 1,4-BDO tiene un punto de ebullición de aproximadamente 230°C y es completamente miscible con agua. Además, no se han identificado disolventes que puedan extraer de manera económica 1,4-BDO del agua. Como molécula neutra, se impide el aislamiento mediante cristalización de una forma de sal. El 1,4-BDO tiene un peso molecular lo suficientemente bajo para pasar a través de una membrana de nanofiltración tal como se describe en el ejemplo III a continuación. Además, la solubilidad de diversas sales de medios de fermentación en 1,4-BDO puro es relativamente baja, tal como se describe en el ejemplo VI a continuación.
- 10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de aislamiento de 1,4-butanodiol (1,4-BDO) a partir de un caldo de fermentación que incluye (1) separar una fracción líquida enriquecida en 1,4-BDO de una fracción sólida que incluye células; (2) retirar agua de la fracción líquida; (3) retirar sales de la fracción líquida, y (4) purificar 1,4-BDO.
- 15 Un experto en la técnica reconocerá que dada la orientación de las enseñanzas divulgadas en el presente documento con respecto al compuesto 1,4-BDO a modo de ejemplo, pueden aislarse otros compuestos de interés miscibles con agua que tienen puntos de ebullición mayores que el agua usando los mismos procedimientos. Por ejemplo, los métodos divulgados en el presente documento se modifican fácilmente para permitir el aislamiento de 1,3-butanodiol. Por tanto, aunque el 1,4-BDO ejemplifica muchas realizaciones, se entiende que los métodos se pueden adaptar fácilmente a otros compuestos de interés miscibles con agua que tienen puntos de ebullición mayores que el agua.
- 20 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de 1,4-butanodiol (1,4-BDO) a partir de un caldo de fermentación. El procedimiento incluye separar una fracción líquida enriquecida en 1,4-BDO de una fracción sólida que incluye células. Se evapora agua de la fracción líquida antes o después de separar sales de la fracción líquida. En algunas realizaciones, se separa 1,4-BDO de las sales que han cristalizado después de la retirada de agua tal como se describe adicionalmente a continuación. Las sales tienen una baja solubilidad en 1,4-BDO de manera que el 1,4-BDO separado está libre de sal en aproximadamente el 98%. En algunas realizaciones, se separan las sales mediante métodos especiales de filtración y/o intercambio iónico, o métodos cromatográficos antes de la retirada de agua tal como se describe adicionalmente a continuación.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, "aislamiento" se refiere a un procedimiento que incluye etapas de purificación para obtener un compuesto de interés sustancialmente purificado. En realizaciones particulares, un compuesto de interés incluye 1,4-BDO. Un compuesto sustancialmente purificado incluye los que están libres de sal en al menos el 98%, en algunas realizaciones, libres de sal en al menos el 99% en otras realizaciones, y libres de sal en al menos el 99,5% en aún otras realizaciones. Un compuesto sustancialmente purificado también incluye los que están también libres de otras impurezas además de sales, de manera que el compuesto de interés es puro en el menos el 98% en algunas realizaciones, puro en al menos el 99% en otras realizaciones, y puro en al menos el 99,5% en aún otras realizaciones adicionales.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "fracción líquida" se refiere a un líquido sobrenadante o centrifugado obtenido tras la retirada de masa sólida del caldo de fermentación. La retirada de masa sólida incluye, algo, sustancialmente toda, o toda una masa sólida. Por ejemplo, en centrifugación, la fracción líquida es el centrifugado o sobrenadante que se separa de los sólidos. La fracción líquida también es la porción que es el permeado o sobrenadante obtenido tras la filtración a través de una membrana. La fracción líquida también es la porción que es el filtrado o sobrenadante obtenido después de que se hayan aplicado uno o más métodos de filtración.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, el término "fracción sólida" se refiere a una porción del caldo de fermentación que contiene materiales insolubles. Tales materiales insolubles incluyen, por ejemplo, células, residuos celulares, proteínas precipitadas, finos, y similares. Los finos se refieren a sólidos pequeños, habitualmente amorfos. Los finos también pueden crearse durante la cristalización o durante la retirada de agua del caldo de fermentación. Los finos pueden estar formados por un compuesto de interés que puede disolverse y retirarse por recristalización. Los finos pueden incluir porciones de la fracción sólida que son demasiado pequeñas para capturarse en una filtración por membrana.
- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "sales" usado de manera intercambiable con sales de medios y sales de medios de fermentación, se refiere a los compuestos iónicos disueltos usados en un caldo de fermentación. Las sales en un caldo de fermentación pueden incluir, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, y tampones tales como sales de fosfato, citrato, acetato y borato de sodio y/o potasio y/o amonio.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente toda" cuando se usa en referencia a la retirada de agua o sales se refiere a la retirada de al menos el 95% de agua o sales. "Sustancialmente toda" también puede incluir al menos el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 99,9% de la retirada o cualquier valor entre medias.
- 50
- 55
- 60
- 65

Tal como se usa en el presente documento, el término “inactivación génica” o equivalentes gramaticales del mismo, se pretende que signifique una alteración genética que hace que el producto génico codificado esté inactivo. La alteración genética puede ser, por ejemplo, la delección de todo el gen, la delección de una secuencia reguladora requerida para la transcripción o traducción, la delección de una porción del gen que resulta en un producto génico truncado o por cualquiera de diversas estrategias de mutación que inactivan el producto génico codificado. Un método particularmente útil de inactivación génica es la delección completa del gen porque reduce o elimina la aparición de reversiones genéticas en los microorganismos que no se producen de manera natural de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “microorganismo” se pretende que signifique una célula u organismo procariota o eucariota que tiene un tamaño microscópico. El término se pretende que incluya bacterias de todas las especies y organismos eucariotas tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie que puede cultivarse para la producción de un producto bioquímico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “microorganismo que produce 1,4-BDO” se pretende que signifique un microorganismo diseñado mediante ingeniería genética para biosintetizar 1,4-BDO en cantidades útiles. El organismo diseñado mediante ingeniería genética puede incluir inserciones génicas, que incluyen insertos de plásmido y/o inserciones cromosómicas. El organismo diseñado mediante ingeniería genética también puede incluir inactivaciones génicas para optimizar adicionalmente el flujo de carbono a través de las rutas deseadas para la producción de 1,4-BDO. Los organismos que producen 1,4-BDO pueden incluir una combinación de inserciones y delecciones.

“Exógena” tal como se usa en el presente documento se pretende que signifique que la molécula citada o la actividad citada se introduce en el organismo microbiano huésped. La molécula puede introducirse, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético del huésped tal como mediante integración en un cromosoma del huésped o como material genético no cromosómico tal como un plásmido. Por tanto, el término tal como se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo huésped de referencia. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad citada tras la introducción en el organismo microbiano huésped. Por tanto, el término “endógena” se refiere a una molécula o actividad citada que está presente en el huésped. De manera similar, cuando se usa el término en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano. El término “heteróloga” se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de las especies citadas, mientras que “homóloga” se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano huésped. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede usar o bien un ácido nucleico codificante heterólogo o bien homólogo o ambos.

La invención proporciona un procedimiento de purificación de un compuesto de interés, 1,4-BDO, a partir de un caldo de fermentación, teniendo dicho compuesto un punto de ebullición mayor que el agua y una baja solubilidad de sal, y siendo miscible con agua. El compuesto de interés según la invención es 1,4-BDO. El procedimiento incluye separar una fracción líquida que contiene el producto de interés según la invención de una fracción sólida que incluye la masa celular. La masa celular incluye los organismos microbianos usados en la producción del compuesto de interés. La fracción sólida también incluye residuos celulares, finos, proteínas, y otros materiales insolubles de la fermentación.

El procedimiento de aislamiento también incluye retirar las sales y el agua de la fracción líquida. El orden en el que se retiran es irrelevante. En algunas realizaciones, puede haber retirada parcial de sales, seguido por retirada de sustancialmente toda el agua, y luego las sales restantes. En otras realizaciones, puede haber retirada parcial de agua, seguido por retirada de sustancialmente todas las sales, y luego el agua restante. En otras realizaciones, puede retirarse parcialmente el agua antes de la separación de la fracción sólida del caldo de fermentación. En aún otras realizaciones, puede realizarse la retirada final de sustancialmente toda el agua como parte de las etapas de purificación, por ejemplo, mediante destilación. Tal como se divulga a continuación en el ejemplo VI, el 1,4-BDO puro no solubiliza de manera apreciable sales típicas de medios de fermentación. Por tanto, 1,4-BDO puede separarse de las sales mediante la evaporación del agua de la fracción líquida. Tal como se muestra en el ejemplo V a continuación, las sales empiezan a separarse por cristalización cuando las concentraciones de 1,4-BDO son de aproximadamente el 30% en peso. En algunas realizaciones, 1,4-BDO está libre de sal en al menos el 98% tras la separación de 1,4-BDO de sales cristalizadas o precipitadas mediante retirada de agua. Tal como puede observarse a partir del ejemplo VI, los homólogos estrechamente relacionados etanodiol y propanodiol aún solubilizan de manera apreciable sales de fermentación. Por tanto, pueden emplearse otros métodos para retirar sales incluso tras la retirada de sustancialmente toda el agua.

Finalmente, cuando se han retirado las sales y el agua, el líquido o sólido restante puede someterse a purificación final. Cuando el producto de interés es un líquido, la purificación puede lograrse mediante destilación incluyendo mediante destilación fraccionada o destilación múltiple, por ejemplo. Cuando el producto de interés es un sólido, la purificación puede lograrse mediante recristalización.

El procedimiento global para producir y aislar un compuesto de interés y recircular diversos componentes del caldo de fermentación se resumen en el diagrama de flujo de bloques de la figura 1. La etapa 100 es una fermentación que utiliza materia prima de carbono, tal como sacarosa, para producir el compuesto de interés. La etapa 110 es la separación de células del caldo de fermentación que proporciona una fracción líquida, con la etapa 115 como recirculación opcional de las células. La etapa 110 se ha ejemplificado en los ejemplos I y II en los que las células y los sólidos se separan del caldo de fermentación mediante centrifugación y ultrafiltración. En la etapa 120, se separan sales de la fracción líquida, con la etapa 125 como recirculación opcional de las sales. La etapa 120 se ha ejemplificado en los ejemplos III-V, que describen nanofiltración (ejemplo III) e intercambio iónico (ejemplo IV), en los que el agua aún está presente en la fracción líquida. El ejemplo V muestra la separación de sales mediante cristalización durante la evaporación de agua. La etapa 130 es la retirada de agua mediante evaporación, con la etapa 135 como una recirculación opcional del agua. La etapa 130 se ejemplifica por el ejemplo V, que muestra la evaporación de agua que facilita la separación de sales mediante precipitación. El orden de las etapas 120 y 130 se puede intercambiar tal como se describe adicionalmente a continuación. Finalmente en la etapa 140 el compuesto de interés se somete a purificación final.

En algunas realizaciones, un procedimiento de aislamiento de 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación implica separar una fracción líquida enriquecida en el compuesto de interés de una fracción sólida que incluye células. En la separación de una fracción líquida enriquecida en el compuesto de interés, puede procesarse cualquier cantidad del caldo de fermentación incluyendo el 1%, el 5%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, incluyendo hasta la totalidad del volumen del caldo de fermentación y todos los valores entre medias, e incluyendo además volúmenes de menos del 1% del volumen total del caldo de fermentación. Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de caldo de fermentación procesada puede depender del tipo de procedimiento de fermentación, tales como en discontinuo, semicontinuo o continuo, tal como se detalla a continuación. La separación de sólidos que incluyen células y otras impurezas y subproductos sólidos del caldo de fermentación puede lograrse mediante centrifugación, filtración, o una combinación de estos métodos.

En algunas realizaciones, puede usarse centrifugación para proporcionar una fracción líquida que comprende el compuesto de interés, tal como 1,4-BDO, sustancialmente libre de sólidos incluyendo la masa celular. Dependiendo del tamaño y la configuración de la centrífuga, las velocidades de funcionamiento pueden variar de entre 500 a 12,000 rpm que producen una fuerza centrífuga de hasta 15,000 veces la fuerza de la gravedad. En la técnica se conocen muchas configuraciones de la centrífuga para la retirada de células y sólidos de un caldo de fermentación. Una configuración de este tipo es, por ejemplo, la centrífuga 200 de discos mostrada en la figura 2.

La separación en una centrífuga de pilas de discos centrífuga de pilas de discos tiene lugar dentro de un tazón giratorio. La alimentación se introduce al tazón giratorio desde la parte superior mediante una tubería 220 de entrada estacionaria, y se acelera en el distribuidor 230, antes de entrar en la pila 240 de discos. El distribuidor está diseñado para acelerar el líquido de alimentación.

La separación de líquido-sólidos o líquido-líquido-sólidos tiene lugar entre los discos. En un sistema de dos fases, tal como con fase de aceite inmiscible y agua, la fase de aceite que se mueve a través de la pila de discos hasta el centro y puede descargarse a través de tuberías 250 y pulverizarse en un bastidor recolector. El agua y los sólidos separados del aceite se mueven hasta la periferia, el agua se conduce mediante canales en el disco 260 superior hasta la cámara centrípeta, donde se bombea fuera del rotor por medio de un disco 270 centrípeta incorporado.

Los sólidos se recogen en la periferia, de donde pueden descargarse de manera intermitente mediante un ciclón de centrífuga. La descarga de sólidos puede lograrse mediante un sistema hidráulico que a intervalos adecuados preestablecidos fuerza el fondo 280 del tazón deslizante a descender, abriendo el orificio de sólidos en la periferia del tazón.

Una centrífuga de pilas de discos separa sólidos y una o dos fases de líquido entre sí, normalmente en un procedimiento continuo. Los sólidos más densos se fuerzan hacia fuera mediante fuerzas centrífugas mientras que las fases de líquido menos densas forman capas concéntricas internas. Al insertar placas especiales (pila de discos), se aumenta la eficacia de separación. Los sólidos pueden retirarse de manera manual, intermitente o continua. Según algunas realizaciones, la masa celular puede reintroducirse de nuevo en la fermentación. En un apartado de centrífuga de pilas de discos típico, la fase líquida se derrama en un área de salida en la parte superior de un tazón en una cámara independiente.

Durante el funcionamiento de una centrífuga de pilas de discos, se introduce la alimentación en el eje del tazón, se acelera a la velocidad, a menudo mediante un conjunto de paleta radial, y fluye a través de una pila de discos cónicos estrechamente espaciados. El espaciamiento entre discos es a menudo de entre 0,5 a 3 mm con el fin de reducir la distancia necesaria para separar partículas sedimentadas del fluido. El ángulo de disco es a menudo de entre 40 y 50 grados para facilitar el transporte de sólidos hacia abajo por la superficie de disco hacia el interior del espacio de retención de sólidos.

El mecanismo de separación se basa en la sedimentación de sólidos bajo la influencia de una fuerza centrífuga

contra la parte inferior de los discos y se desliza hacia abajo por el disco hacia el interior del espacio de retención de sólidos. Al mismo tiempo, el fluido aclarado se mueve hacia arriba del canal entre los discos y abandona la centrífuga a través de una bomba centrípeta. Los sólidos sedimentados se descargan o bien continuamente a través de boquillas o bien intermitentemente a través de orificios en la periferia del tazón.

5 La centrífuga de pilas de discos puede usarse a baja concentración y tamaño de las partículas de células en un caldo de fermentación. Puede emplearse una centrífuga de pilas de discos cuando la célula y otra masa sólida incluyen tan poco como aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 3% en peso del caldo de fermentación. También puede usarse la centrífuga de pilas de discos cuando la célula y otra masa sólida son menores de
10 aproximadamente el 0,2% en peso, por ejemplo, el 0,01%, el 0,05% y el 0,1% en peso, incluyendo todos los valores entre medias. También puede usarse la centrífuga de pilas de discos cuando la célula y otra masa sólida son mayores del 3% en peso, por ejemplo, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10% y el 15% en peso, incluyendo todos los valores entre medias. Cuando la masa celular combinada y otros sólidos es mayor que
15 aproximadamente el 3% a aproximadamente el 15% en peso, pueden usarse otras configuraciones de centrifugación, tal como una centrífuga decantadora.

Las células y otras partículas sólidas que son suaves, plásticas y no abrasivas, que oscilan entre aproximadamente 0,5 micrómetros y aproximadamente 500 micrómetros son generalmente muy adecuadas para la centrifugación por discos. Para materia particulada de menos de aproximadamente 0,5 micrómetros, es útil la ultrafiltración. Asimismo,
20 por encima de aproximadamente 500 micrómetros, puede ser útil una centrífuga de tipo decantador. El tamaño de una célula procariota típica que puede cultivarse para producir 1,4-BDO tiene un tamaño que puede oscilar entre aproximadamente 0,5 micrómetros y aproximadamente 10 micrómetros, haciendo la centrifugación por discos un método muy adecuado.

25 Tras fermentación discontinua, o durante fermentación semicontinua o continua, pueden retirarse células y sólidos insolubles del caldo de fermentación mediante una centrífuga de pilas de discos. Los productos de salida de una centrífuga de pilas de discos son un centrifugado aclarado (libre de células) y una corriente de flujo inferior que contiene de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 50% de sólidos. La corriente de sólidos de flujo inferior de la centrífuga de pilas de discos puede contener una cantidad significativa del producto de interés que puede
30 recuperarse. Una manera de recuperar el compuesto adicional de interés de los sólidos es incluir etapas de centrifugación adicionales. Además de proporcionar una mayor recuperación del compuesto de interés, la centrifugación múltiple también sirve para concentrar adicionalmente las células y los sólidos. Las células concentradas pueden recircularse de nuevo a la fermentación. La recirculación de células es particularmente útil cuando se están usando organismos diseñados por ingeniería genética valiosos.

35 En algunas realizaciones, puede emplearse una centrífuga decantadora para separar las células y los sólidos. Se obtiene normalmente un buen rendimiento con una centrífuga decantadora para sólidos que tienen tamaños de partícula con un límite inferior que se aproxima a aproximadamente 10 micrómetros, aunque pueden procesarse partículas más pequeñas dependiendo de su velocidad de sedimentación tal como se describe adicionalmente a
40 continuación. Esta configuración de centrífuga puede usarse cuando las células de un cultivo están en el intervalo de tamaño más grande de un organismo procariota típico. Un experto en la técnica apreciará que las células eucariotas son a menudo mucho más grandes que las células procariotas, oscilando el tamaño de una célula eucariota normal entre aproximadamente 10 micrómetros y aproximadamente 100 micrómetros o más grande. Aunque una centrífuga de pilas de discos puede funcionar bien en este intervalo de tamaño, una centrífuga decantadora es útil porque es
45 capaz de gestionar cantidades más grandes de sólidos. Por tanto, cuando la masa celular más otros sólidos es más de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 50% de la masa en peso, puede usarse una centrífuga decantadora. Esta concentración se aplica al flujo inferior de la centrífuga de pilas de discos descrita anteriormente, haciendo que una centrífuga decantadora sea un método muy adecuado para concentrar adicionalmente la masa celular y recuperar producto adicional.

50 La centrífuga decantadora o de tazón sólido funciona sobre el principio de sedimentación. Se describen aparatos a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses nº 4.228.949 y 4.240.578. En un aparato 300 de este tipo, tal como se muestra en la figura 3, la parte central de la máquina es tambor 310 giratorio, que contiene un tornillo 320 giratorio independiente. El caldo de fermentación o alimentación que contiene sólidos, tal como el flujo inferior de la
55 centrífuga de pilas de discos se alimenta mediante la tubería 330 de entrada a la cámara 340 de mezclado en el núcleo de la primera parte del tornillo. El caldo pasa entonces a través de los orificios en la cámara de mezclado al exterior hacia las paredes exteriores del tambor. El caldo deshidratado se transporta fuera a través de la máquina mediante el tornillo. El centrifugado 350, o sobrenadante, se decanta de la superficie interna de la reserva a través de tuberías de centrifugado. El nivel de agua en el tambor puede ajustarse según las características del material que va a procesarse.

60 El tambor y el tornillo giran independientemente entre sí a velocidades de hasta aproximadamente 3,600 rpm, dependiendo del tipo y tamaño de la máquina. Los principios de deshidratación usados se conocen en la técnica como el método "concurrente" o "contracorriente". El método concurrente permite velocidades diferenciales muy
65 bajas. La velocidad diferencial es la diferencia entre la velocidad del tambor y la velocidad del tornillo. Velocidades diferenciales bajas significan unos tiempos de residencia más largos en la centrífuga, que dan como resultado

suspensiones más secas y un desgaste considerablemente menor. El principio contracorriente puede ser más adecuado para una alimentación que es fácil de deshidratar y cuando se desea una alta capacidad.

5 Los sólidos pueden separarse en centrifugas de tazón sólido siempre que su velocidad de sedimentación en la porción de fase líquida de la alimentación sea suficiente. Los factores que influyen la velocidad de sedimentación incluyen, por ejemplo, tamaño de partícula, conformación, diferencias en la densidad entre las células/sólidos y la fase líquida del caldo de fermentación, y viscosidad. La geometría del tazón, especialmente la relación entre la longitud y el diámetro, se pueden adaptar para ajustarse a las condiciones particulares. En algunas realizaciones, pueden obtenerse buenos resultados a una relación de diámetro-longitud que oscila entre aproximadamente 2:1 y
10 aproximadamente 3:1.

En funcionamiento, la separación tiene lugar en un tazón cilíndrico cónico horizontal equipado con un transportador de tornillo sin fin. El caldo de fermentación se alimenta en el tazón a través de un tubo de entrada estacionario y se acelera mediante un distribuidor de entrada. La fuerza centrífuga proporciona los medios para la sedimentación de los sólidos sobre la pared del tazón. Un transportador, que gira en la misma dirección que el tazón con velocidad diferencial, transporta los sólidos al extremo cónico. Los sólidos se separan entonces de la fase líquida y se deshidratan mediante centrifugación antes de descargarse en un canal de recogida. La fase líquida restante entonces fluye al interior de un alojamiento a través de un orificio en el extremo cilíndrico del tazón.

20 Tal como se describió anteriormente, las células y los sólidos pueden separarse mediante centrifugación múltiple para aumentar el rendimiento aislado del compuesto de interés. La centrifugación múltiple puede incluir centrifugación dos veces, tres veces, cuatro veces, y cinco veces, por ejemplo. Las corrientes de flujo inferior intermedias pueden diluirse con agua para aumentar adicionalmente la recuperación del producto líquido. También puede usarse cualquier combinación de configuraciones de centrifugación para realizar centrifugaciones múltiples, tales como combinaciones de las centrifugaciones por discos y decantadoras descritas anteriormente. Pueden retirarse sólidos adicionales que no pueden separarse mediante centrifugación a través de un procedimiento de filtración, tal como ultrafiltración.

30 La ultrafiltración es un procedimiento de separación selectiva a través de una membrana que usa presiones de hasta aproximadamente 145 psi (10 bar). Las configuraciones útiles incluyen filtración de flujo cruzado que usan elementos de ultrafiltración enrollados en espiral, de fibra hueca o lámina plana (cartucho). Estos elementos consisten en membranas poliméricas o cerámicas con un punto de corte de peso molecular de menos de aproximadamente 200.000 Dalton, por ejemplo, membrana 5K PES de Hydranautics tal como se usa en el ejemplo I a continuación. Las membranas de ultrafiltración cerámicas también son útiles puesto que tienen vidas útiles de funcionamiento
35 largas de hasta o más de 10 años. Las cerámicas tienen la desventaja de ser mucho más caras que las membranas poliméricas. La ultrafiltración concentra sólidos en suspensión y solutos de peso molecular superior a aproximadamente 1.000 Dalton. La ultrafiltración incluye filtrar a través de una membrana que tiene puntos de corte de peso molecular (MWCO) nominal de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 200.000 Dalton (tamaños de poro de aproximadamente 0,005 a 0,1 micrómetros). El término punto de corte de peso molecular se usa para definir el tamaño de proteína que será retenido por la membrana en aproximadamente el 90%. Al usar ultrafiltración, el líquido permeado contendrá solutos orgánicos de bajo peso molecular, tales como 1,4-BDO, sales de medios y agua. Los sólidos capturados pueden incluir, por ejemplo, residuos celulares, ADN y proteínas residuales.

45 Además del uso de la ultrafiltración tras la centrifugación, la ultrafiltración también puede usarse tras la microfiltración. La microfiltración proporciona un medio alternativo a la centrifugación para separar las células. La microfiltración implica habitualmente un procedimiento de membrana de flujo cruzado de baja presión para separar las partículas coloidales y en suspensión en el intervalo de aproximadamente 0,05-10 micrómetros. La microfiltración incluye filtrar a través de una membrana que tiene tamaños de poro de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 5,0 micrómetros. Pueden usarse membranas de microfiltración de cerámica o de acero tienen vidas útiles de funcionamiento largas, incluyendo hasta o más de 10 años. La microfiltración puede usarse en el aclaramiento del caldo de fermentación. A diferencia de la ultrafiltración, la microfiltración generalmente no captura residuos celulares, ADN y proteínas residuales. Sin embargo, es útil usar una serie de etapas de filtración con una disminución
50 progresiva del tamaño de poro con el fin de evitar el ensuciamiento de las membranas de filtro. Esto es útil para optimizar la reutilización de la membrana de filtro. En algunas realizaciones, puede usarse una única etapa de ultrafiltración para retirar tanto la masa celular (en lugar de centrifugación o microfiltración) como residuos celulares, ADN y proteínas residuales, etc. Los elementos de ultrafiltración cerámicos son útiles para esta aplicación debido a su capacidad para tolerar los ciclos de limpieza frecuentes usados en este modo de funcionamiento.

60 Se usa un método de filtración adicional denominado nanofiltración para separar determinadas sales. Esta etapa del procedimiento puede permitir la recuperación de determinadas sales de medios sin previa evaporación de agua, por ejemplo. La nanofiltración puede separar sales, eliminar color y proporcionar desalinización. En la nanofiltración, el líquido permeado generalmente contiene iones monovalentes y compuestos orgánicos de bajo peso molecular tal como se ejemplifica por 1,4-BDO. La nanofiltración incluye filtrar a través de una membrana que tiene puntos de corte de peso molecular (MWCO) nominal desde aproximadamente 100 Dalton hasta aproximadamente 2.000

Dalton (tamaños de poro de aproximadamente 0,0005 a 0,005 micrómetros). Un método para la nanofiltración es la filtración de flujo cruzado que usa un elemento enrollado en espiral. Existen varias membranas de nanofiltración disponibles, por ejemplo, la membrana de nanofiltración compuesta de película fina CE DK usada en el ejemplo III a continuación. El mecanismo de transferencia de masa en la nanofiltración es difusión. La membrana de nanofiltración permite la difusión parcial de determinados solutos iónicos (tal como sodio y cloruro), predominantemente iones monovalentes, así como agua. Se retienen sustancialmente especies iónicas más grandes, incluyendo iones divalentes y multivalentes, y moléculas más complejas.

Puesto que los iones monovalentes se difunden parcialmente a través de la membrana de nanofiltración junto con el agua, la diferencia de presión osmótica entre las disoluciones en cada lado de la membrana no es tan grande y esto normalmente da como resultado una presión de funcionamiento algo más baja con nanofiltración en comparación con, por ejemplo, ósmosis inversa.

La nanofiltración no sólo retira una porción de las sales inorgánicas sino que también puede retirar sales de ácidos orgánicos. La retirada de subproductos de ácido orgánico puede ser importante en el procedimiento de aislamiento ya que tales ácidos pueden catalizar o servir como un reactivo en reacciones secundarias no deseables con un producto de interés. En el contexto de realizaciones específicas relacionadas con el aislamiento de 1,4-BDO, por ejemplo, la retirada de ácidos orgánicos es particularmente útil porque puede impedir reacciones tales como la esterificación de los grupos hidroxilo durante las temperaturas elevadas de cualquier etapa de evaporación o destilación posterior. Estos subproductos de éster tienen normalmente puntos de ebullición mayores que BDO lo que da como resultado pérdidas de rendimiento de la corriente más pesada en la destilación.

La nanofiltración también puede separar el sustrato de glucosa o sacarosa del producto de interés, impidiendo reacciones de degradación durante la evaporación y destilación. Estas reacciones de degradación pueden producir coloración del compuesto de interés. El retenido de nanofiltración rico en sal y sustrato puede ser más adecuado para recirculación a fermentación en comparación con una corriente de sal recuperada de la cristalización por evaporación. Por ejemplo, el uso de métodos de filtración en lugar de métodos que implican la aplicación de calor puede dar como resultado menores productos de degradación. Tales productos de degradación pueden ser tóxicos para el organismo de fermentación.

Tanto la nanofiltración como el intercambio iónico pueden retirar compuestos que forman color y compuestos que absorben UV. Esto puede ser útil en el contexto de algunos compuestos de interés. Por ejemplo, la eliminación de color es útil en la producción de 1,4-BDO de calidad para polímeros.

Pueden usarse membranas de filtración múltiple en serie con un aumento gradual de refinamiento del tamaño de los sólidos que se retienen. Esto puede ser útil para reducir el ensuciamiento de membranas y ayudar en la recuperación de componentes individuales del caldo de fermentación para la recirculación. Por ejemplo, una serie de filtraciones puede usar microfiltración, seguido por ultrafiltración, seguido por nanofiltración. Por tanto, la microfiltración ayuda en la recuperación de masa celular, la ultrafiltración retira componentes grandes tales como residuos celulares, ADN y proteínas, y la nanofiltración ayuda en la recuperación de sales.

Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier de los diversos tipos de filtración puede integrarse dentro del contexto de una variedad de configuraciones del biorreactor de fermentación dadas las enseñanzas y orientación proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la filtración se produce fuera del biorreactor. De este modo, cualquier cantidad del caldo de fermentación puede retirarse del biorreactor y filtrarse por separado. Puede ayudarse la filtración mediante el uso de métodos por vacío, o el uso de presión positiva. En algunas realizaciones, la filtración celular puede lograrse por medio de un elemento de filtración interno al biorreactor. Tales configuraciones incluyen las encontradas en biorreactores de recirculación de células de membrana (MCRB). Chang *et al.* patente estadounidense nº 6.596.521 han descrito un reactor continuo de recirculación de células de dos fases.

En algunas realizaciones, las células pueden separarse y recircularse a la mezcla de fermentación por medio de un sedimentador de células acústico tal como se describe por Yang *et al.* (Biotechnol. Bioprocess. Eng., 7:357-361(2002)). La sedimentación acústica de células usa ultrasonidos para concentrar la suspensión de células en un caldo de fermentación. Este método permite un retorno fácil de las células al biorreactor y previene el problema de ensuciamiento de la membrana que a veces complica los sistemas de recirculación de células de tipo filtración.

Con respecto al aislamiento de sales antes de la evaporación de agua, se usan otros métodos en combinación con los procedimientos de filtración a modo de ejemplo anteriores. Tales otros métodos son intercambio iónico. Por ejemplo, Gong *et al.* (Desalination 191:1-3, 193-199 (2006)) han descrito los efectos de las propiedades de transporte de membranas de intercambio iónico sobre la desalinización de caldo de fermentación de 1,3-propanodiol mediante electrodiálisis.

Los elementos de intercambio iónico pueden tomar la forma de perlas de resina así como membranas. Frecuentemente, las resinas se moldean por colada en forma de perlas porosas. Las resinas pueden ser polímeros reticulados que tienen grupos activos en forma de sitios cargados eléctricamente. En estos sitios, los iones de carga opuesta se atraen pero pueden reemplazarse por otros iones según sus concentraciones relativas y afinidades para

los sitios. Los intercambiadores de iones pueden ser catiónicos o aniónicos, por ejemplo. Los factores que determinan la eficacia de una resina de intercambio iónico dada incluyen la preferencia para un ion dado, y el número de sitios activos disponibles. Para maximizar los sitios activos, son generalmente útiles grandes áreas de superficie. Por tanto, son útiles partículas pequeñas debido a su gran área de superficie.

El polímero de resina puede incluir reticulación en el orden de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 15 por ciento, por ejemplo. La temperatura y el pH también afectan la eficacia de intercambio iónico. Por ejemplo, el pH puede afectar el número de iones disponibles para intercambio, y la temperatura afecta la cinética del procedimiento. En algunas realizaciones, la retirada de sal mediante intercambio iónico incluye retirada de ácidos orgánicos y sales de ácidos orgánicos. La forma aniónica de ácidos orgánicos puede unirse a un sitio de intercambio aniónico activo. En algunas realizaciones, el pH para unir un ácido orgánico está por debajo del pKa para ese ácido. El pKa de ácido láctico, por ejemplo, es aproximadamente 3,1. Un método eficaz para retirar sales de ácidos orgánicos es intercambio catiónico seguido por intercambio aniónico. La resina catiónica retira en primer lugar el contraión de ácido orgánico (calcio, sodio, amonio, y similares), bajando el pH de la disolución. Entonces la resina aniónica se une al ácido libre.

Un aspecto útil del intercambio iónico es la facilidad con la que puede regenerarse la resina. La resina puede lavarse libre de los iones intercambiados y ponerse en contacto con una disolución de iones deseables para reemplazarlos. Con la regeneración, las mismas perlas de resina pueden usarse una y otra vez, y los iones aislados pueden concentrarse en un efluente residual. Como muchos métodos de filtración, puede realizarse intercambio iónico en serie, tal como se ejemplifica en el ejemplo IV. Por tanto, puede hacerse pasar una alimentación a través de cualquier número de intercambiadores aniónicos y catiónicos, o intercambiadores de lecho mixto, y en cualquier orden.

En algunas realizaciones, se usa la retirada de agua mediante evaporación para facilitar la recuperación de sal. En algunas realizaciones, las sales se han retirado antes de la retirada de agua. En cualquier caso, el agua evaporada puede recircularse a la fermentación como agua complementaria, minimizando los requisitos de agua globales para el procedimiento. En el caso en el que las sales no se hayan retirado, su solubilidad en la fase líquida enriquecida con 1,4-BDO es lo suficientemente baja de manera que pueden cristalizar tras la retirada de agua. En algunas realizaciones, las sales tienen una solubilidad lo suficientemente baja en 1,4-BDO de manera que el 1,4-BDO separado está libre de sal en aproximadamente el 98%.

Puede usarse un cristizador evaporativo para generar sales precipitadas que pueden retirarse mediante centrifugación, filtración u otros medios mecánicos. En el contexto del aislamiento de 1,4-BDO, un cristizador evaporativo sirve para retirar agua del caldo de fermentación creando una fase líquida que ha retirado suficiente agua para provocar sobresaturación de las sales de medios de fermentación y posterior cristalización en la fase líquida restante o aguas madres. Tal como se demuestra en el ejemplo V a continuación, la cristalización de sales comienza a una concentración de 1,4-BDO de aproximadamente el 30% en peso.

Las aguas madres se refieren al disolvente a granel en una cristalización. Frecuentemente, las aguas madres son una combinación de disolventes con diferente capacidad para solubilizar o disolver diversos solutos. En el contexto de la purificación de 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación, por ejemplo, las aguas madres incluyen la fracción líquida obtenida tras retirar células y otros sólidos del caldo de fermentación. En el contexto de aislar un compuesto de interés a partir de un caldo de fermentación, el soluto primario incluye las sales de medios de fermentación y ácidos orgánicos.

La sobresaturación en la cristalización se refiere a una condición en la que un soluto está más concentrado en un disolvente a granel de lo que normalmente es posible bajo condiciones de temperatura y presión dadas. El disolvente a granel del caldo de fermentación es agua que contiene cantidades relativamente más pequeñas de 1,4-BDO, por ejemplo, y sales disueltas y otros medios.

Un cristizador evaporativo a modo de ejemplo es el cristizador de circulación forzada (FC) tal como se muestra en las figuras 5 y 6. Se ha descrito un cristizador de FC, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 3.976.430. El cristizador de FC evapora agua dando como resultado una sobresaturación aumentada de las sales en la fracción líquida enriquecida con el compuesto (tal como 1,4-BDO), provocando así que las sales se cristalicen. El cristizador de FC es útil para lograr altas tasas de evaporación. El cristizador de FC consiste en cuatro componentes básicos: un recipiente cristizador con una parte inferior cónica, una bomba de circulación, un intercambiador de calor, y equipo de vacío que gestiona los vapores generados en el cristizador. La suspensión del recipiente cristizador se circula a través del intercambiador de calor, y se devuelve de nuevo al recipiente cristizador, en el que se reduce la sobresaturación mediante la deposición de sales sobre los cristales presentes en la suspensión. El agua evaporada se conduce al sistema de vacío, en el que se condensa y recircula al caldo de fermentación según se desee. Aunque en algunas realizaciones hay un vacío bajo, también es posible usar el cristizador de FC a aproximadamente presión atmosférica. En algunas realizaciones, el cristizador de FC utiliza enfriamiento evaporativo adiabático para generar la sobresaturación de sal. En tales realizaciones, el cristizador de FC no necesita estar equipado con un intercambiador de calor.

En algunas realizaciones, el cristizador de FC puede estar equipado además con deflectores internos, tal como se muestra en la figura 6, para gestionar el desbordamiento de la fase líquida y para reducir los finos que pueden inhibir el crecimiento de cristales. Las sales generadas en el cristizador de FC también pueden seleccionarse por el tamaño con la ayuda de una columna de elutriación opcional. Esta parte del cristizador de FC aparece en el fondo de la sección cónica del recipiente cristizador. La selección por tamaño se logra proporcionando un flujo de fluido de fermentación hacia arriba por la columna, permitiendo únicamente que las partículas con una velocidad de sedimentación particular se muevan contra este flujo. La velocidad de sedimentación está relacionada con el tamaño y la forma de los cristales así como a la viscosidad del fluido. En realizaciones adicionales, el cristizador de FC también puede estar equipado con un lavador químico interno para reducir pérdidas de producto. Esto puede ayudar en la recuperación de productos volátiles.

El cristizador de turbulencia o de tubo de aspiración-deflector "DTB", mostrado en la figura 7, proporciona dos corrientes de descarga, una de una suspensión que contiene cristales, y otra que es la fase líquida con una pequeña cantidad de finos. La configuración del cristizador de DTB es tal que promueve el crecimiento de cristales, y puede generar cristales de un tamaño promedio más grande que los obtenidos con el cristizador de FC. En algunas realizaciones, el cristizador de DTB funciona en vacío, o a ligera presión superatmosférica. En algunas realizaciones, el cristizador de DTB usa vacío para el enfriamiento.

En algunas realizaciones, un cristizador de DTB funciona a una baja sobresaturación. Un experto en la técnica apreciará que pueden obtenerse cristales grandes bajo este régimen. El sistema puede configurarse opcionalmente para disolver finos para aumentar adicionalmente el tamaño del cristal. Cuando se usa el cristizador de DTB en la recuperación de las sales de medios de fermentación, el tamaño del cristal no es necesariamente una prioridad.

El cristizador de DTB se ha estudiado ampliamente en la cristalización, y puede modelarse con precisión. Sus distintas zonas de crecimiento y fase líquida aclarada facilitan la definición de parámetros cinéticos, y por tanto, pueden calcularse fácilmente la tasa de crecimiento y nucleación. Estas características hacen que el cristizador de DTB sea adecuado para la descripción matemática y, por tanto, sujeto a un buen control de funcionamiento. El cristizador de DTB es un ejemplo de un diseño de suspensión mezclada y separación de productos mezclados (MSMPR), como el cristizador de FC.

El cristizador de DTB incluye un área con deflectores, que sirve como una zona de sedimentación, que es periférica con respecto al volumen activo. Esta zona se usa para procesar adicionalmente la fase líquida y los finos. En algunas realizaciones, el área con deflectores no está presente, como puede ser el caso en el que el procesamiento adicional de finos es menos importante. Una configuración de este tipo se conoce en la técnica como un cristizador de tubo de aspiración. Un cristizador de DTB puede estar equipado con un agitador, habitualmente en el fondo del aparato en la proximidad de la entrada de la disolución de alimentación. Como el cristizador de FC, el cristizador de DTB está equipado opcionalmente con una columna de elutriación. En algunas realizaciones, puede usarse un bucle de calentamiento externo opcional para aumentar las tasas de evaporación.

Aún otra configuración de cristizador es el cristizador de circulación inducida tal como se muestra en la figura 8. Esta configuración proporciona medios de agitación adicionales para el volumen activo. El aparato es similar al cristizador de DTB con respecto al uso de un tubo de aspiración. Al contrario que el aparato DTB, no hay ningún agitador interno. En su lugar, un inductor en la parte cónica del recipiente introduce disolución calentada desde una bomba de recirculación. Como con otras configuraciones del aparato de cristalización, el cristizador de circulación inducida está equipado opcionalmente con una columna de elutriación. También pueden emplearse opcionalmente deflectores con este tipo de cristizador.

En realizaciones todavía adicionales, el cristizador puede ser un cristizador de tipo Oslo, tal como se muestra en las figuras 9 y 10. Este tipo de cristizador también se denomina cristizador de tipo "de crecimiento", "de lecho fluido" o "de Krystal". El cristizador Oslo permite el crecimiento de cristales en un lecho fluidizado, que no está sometido a circulación mecánica. Un cristal en una unidad Oslo crecerá hasta un tamaño proporcional a su tiempo de residencia en el lecho fluidizado. El resultado es que un cristizador Oslo puede hacer crecer cristales más grandes que la mayoría de los demás tipos de cristizador. La suspensión puede retirarse del lecho fluidizado del cristizador y enviarse, por ejemplo, a una sección de centrifugación. La fase líquida transparente que contiene 1,4-BDO puede purgarse de la zona de aclaramiento del cristizador.

La cámara de cristalización clasificadora es la parte inferior de la unidad. La parte superior es el área de separación de líquido-vapor en la que se desarrolla sobresaturación mediante la retirada de agua. La fase líquida ligeramente sobresaturada fluye hacia abajo a través de una tubería central y se reduce la sobresaturación por contacto con el lecho fluidizado de cristales. La desobresaturación se produce progresivamente a medida que la fase líquida circulante se mueve hacia arriba a través del lecho clasificante antes de recogerse en la parte superior de la cámara. El líquido restante sale mediante una tubería de circulación y tras la adición de la alimentación nueva, pasa a través del intercambiador de calor en el que se proporciona reposición de calor. Entonces se recircula a la parte superior.

En algunas realizaciones, el cristizador de tipo Oslo también puede estar opcionalmente equipado con deflectores, una columna de elutriación y lavador químico, tal como se describió anteriormente. Dado que los cristales en

crecimiento no están en contacto con ningún dispositivo de agitación, la cantidad de finos que va a destruirse es generalmente menor. El cristalizador de tipo Oslo permite ciclos largos de producción entre periodos para la retirada de cristales.

5 El cristalizador de tipo Oslo es útil para la separación-cristalización de varias especies químicas tal como se encontrarán en sales de medios de fermentación. En una realización, la unidad del cristalizador de tipo Oslo es de tipo "cerrado", tal como se muestra en la figura 9. En otras realizaciones el cristalizador de tipo Oslo es de tipo "abierto" tal como se muestra en la figura 10. Esta última configuración es útil cuando se necesitan grandes áreas de sedimentación, por ejemplo.

10 Muchos de los aparatos de cristalización evaporativa anteriores permiten un crecimiento de cristales controlado. En la recuperación de sales de medios de fermentación de la porción líquida después de la retirada de células, la morfología cristalina exacta, tamaño y similares son generalmente inconsecuentes. De hecho, la recuperación de sales de medios amorfos puede ser suficiente en la purificación de cualquier compuesto de interés, incluyendo 1,4-BDO. Así, en algunas realizaciones, pueden utilizarse otros métodos de evaporación que no controlan el crecimiento de cristales en sí mismo.

15 Cuando se retiran sales mediante nanofiltración e intercambio iónico, puede usarse una filtración por membrana de ósmosis inversa (RO) para retirar una parte del agua antes de la evaporación. El agua permea por la membrana de RO mientras que se retiene 1,4-BDO. En algunas realizaciones, una membrana de RO puede concentrar un producto, tal como 1,4-BDO, hasta aproximadamente el 20%. Un experto en la técnica reconocerá que la presión osmótica del producto 1,4-BDO aumenta hasta un punto en el que una concentración adicional usando una membrana de RO ya no es viable. No obstante, el uso de una membrana de RO es un método de poca entrada de baja útil para concentrar el producto de interés antes del proceso de evaporación de agua más intenso en cuanto a la energía. Por tanto, a gran escala, el empleo de una membrana de RO es particularmente útil.

20 En algunas realizaciones, sustancialmente todas las sales se retiran antes de la retirada de agua. En otras realizaciones, sustancialmente todas las sales se retiran tras la retirada de una porción de agua. La porción de agua retirada puede ser cualquier cantidad incluyendo el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, y todos los valores entre medias. En algunas realizaciones, se retiran sales tras la retirada de sustancialmente toda el agua. Sustancialmente toda el agua incluye el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99,9% y todos los valores entre medias e incluye toda el agua.

25 Existen muchos tipos y configuraciones de evaporadores disponibles para la retirada de agua. Una consideración para diseñar un sistema de evaporación es minimizar los requisitos de energía. Las configuraciones de evaporación tales como efectos múltiples o recompresión de vapor mecánica permiten un consumo de energía reducido. En algunas realizaciones, la retirada de agua se consigue mediante evaporación con un sistema de evaporador que incluye uno o más efectos. En algunas realizaciones, puede usarse un sistema de evaporador de efecto doble o triple para separar agua de 1,4-BDO. Puede usarse cualquiera de varios sistemas de evaporador de efectos múltiples en la retirada de agua. Estos aparatos también pueden aplicarse a cualquier producto de fermentación que tenga un punto de ebullición mayor que el agua. Un evaporador de efecto triple, u otra configuración de aparato evaporativo, puede incluir efectos dedicados que son cristalizadores evaporativos para la recuperación de sal, por ejemplo, el efecto final de una configuración de efecto triple.

35 Un evaporador es un intercambiador de calor en el que se hierve un líquido para dar un vapor que también es un generador de vapor a baja presión. Este vapor se puede utilizar para un calentamiento adicional en otro evaporador denominado otro "efecto". Así, por ejemplo, pueden conectarse dos evaporadores de manera que la línea de vapor de uno está conectada al depósito de vapor del otro, proporcionando un evaporador de dos o de doble efecto. Esta configuración puede propagarse a un tercer evaporador para crear un evaporador de triple efecto, por ejemplo.

40 Por tanto, los evaporadores pueden clasificarse por el número de efectos. En un evaporador de efecto único, el vapor proporciona energía para la vaporización y el producto de vapor se condensa y se retira del sistema. En un evaporador de doble efecto, el producto de vapor del primer efecto se usa para proporcionar energía para una segunda unidad de vaporización. La cascada de efectos puede continuar para cualquier número de fases. Los evaporadores de efectos múltiples pueden retirar grandes cantidades de disolvente de manera más eficaz con respecto a un evaporador de efecto único.

45 En una disposición de efectos múltiples, el calor latente del producto de vapor de un efecto se usa para calentar el siguiente efecto. Los efectos se numeran comenzando con el calentado por el vapor, el efecto I. El primer efecto funciona a la presión más alta. El vapor del efecto I se usa para calentar el efecto II, que por consiguiente funciona a una presión más baja. Esto continúa a través de cada efecto adicional, de modo que la presión disminuye a través de la secuencia y el vapor caliente se desplazará de un efecto al siguiente.

50 En algunas realizaciones, todos los efectos en un evaporador pueden ser físicamente similares en cuanto al tamaño, construcción y área de transferencia de calor. A menos que las pérdidas térmicas sean significativas, también pueden tener la misma capacidad. En trenes de evaporadores, los efectos conectados en serie pueden recibir la

alimentación de varias maneras diferentes. Las disposiciones de alimentación hacia delante siguen los patrones I, II y III. Estos usan una sola bomba de alimentación. En esta configuración, la alimentación se eleva hasta la temperatura de funcionamiento más alta tal como se usa en el efecto I. La temperatura de funcionamiento más baja está en el efecto final, en el que el producto también es el más concentrado. Por tanto, esta configuración es útil para productos que son sensibles al calor o para reducir las reacciones secundarias.

En otras realizaciones, pueden usarse disposiciones de alimentación hacia atrás, III, II, I. En una configuración de este tipo, se usan múltiples bombas para trabajar contra la disminución de presión del sistema, sin embargo, dado que la alimentación se calienta gradualmente, pueden ser más eficaces que una configuración de alimentación hacia delante. Esta disposición también reduce las diferencias de viscosidad a través del sistema y, por tanto, es útil para caldos de fermentación viscosos. En algunas realizaciones, pueden usarse disposiciones de alimentación mixta, entrando la alimentación en el centro del sistema, o los efectos II, III y I. La evaporación final se realiza a la temperatura más alta. Además, se requieren menos bombas que en una disposición de alimentación hacia atrás. En realizaciones todavía adicionales, se usa un sistema de alimentación paralela para dividir la corriente de alimentación y alimentar una porción a cada efecto. Esta configuración es común en evaporadores de cristalización en los que se espera que el producto sea una suspensión.

Existen numerosos diseños de evaporador. Puede usarse cualquier combinación de diseños como efecto tal como se describió anteriormente. Un diseño de evaporador es el evaporador de película descendente. Este aparato incluye un intercambiador de calor de carcasa y tubo vertical, con un separador centrífugo dispuesto lateral o concéntricamente tal como se muestra en la figura 11.

El líquido que va a evaporarse se distribuye uniformemente sobre la superficie interior de un tubo. El líquido fluye hacia abajo formando una película delgada, de la que se produce la evaporación debido al calor aplicado por el vapor. El vapor se condensa y fluye hacia abajo sobre la superficie exterior del tubo. Varios tubos se construyen juntos unos al lado de otros. En cada extremo, los tubos están fijados a placas tubulares, y finalmente el haz de tubos está encerrado por una camisa.

El vapor se introduce a través de la camisa. El espacio entre los tubos forma la sección de calentamiento. El lado interior de los tubos se denomina sección de ebullición. Juntos forman la calandria. El líquido concentrado y el vapor abandonan la calandria en la parte inferior, desde donde se descarga la proporción principal del líquido concentrado. La parte restante entra en el separador posterior tangencialmente junto con el vapor. El concentrado separado se descarga, normalmente por medio de la misma bomba que para la parte principal del concentrado de la calandria, y el vapor abandona el separador desde la parte superior. El vapor de calentamiento, que se condensa sobre la superficie exterior de los tubos, se recoge como condensado en la parte inferior de la sección de calentamiento, desde donde se descarga.

Los evaporadores de película descendente pueden funcionar con diferencias de temperatura muy bajas entre los medios de calentamiento y el líquido de ebullición, y también tienen tiempos de contacto con el producto muy cortos, normalmente unos pocos segundos por pase. Estas características hacen que el evaporador de película descendente sea particularmente adecuado para productos sensibles al calor. El funcionamiento de evaporadores de película descendente con pequeñas diferencias de temperatura facilita su uso en configuraciones de efectos múltiples o en combinación con sistemas mecánicos de compresión de vapor.

La humectación suficiente de la superficie de calentamiento en los tubos de la calandria ayuda a evitar parches secos e incrustaciones que pueden obstruir los tubos. En algunas realizaciones, la tasa de humectación puede aumentarse extendiendo o dividiendo los efectos del evaporador. Los evaporadores de película descendente son altamente sensibles a alteraciones de parámetros tales como suministro de energía, vacío, tasa de alimentación y concentraciones, por ejemplo. En algunas realizaciones, una configuración de evaporador de película descendente de efecto único, doble, triple u otra de efectos múltiples, puede utilizar alimentación de fermentación que se ha filtrado a través de un proceso de nanofiltración tal como se describió anteriormente. La reducción de las sales antes de la evaporación de agua puede ayudar adicionalmente a prevenir la incrustación en los tubos de la calandria.

En algunas realizaciones, el evaporador de película descendente es un evaporador de trayecto corto. En funcionamiento, la fracción líquida se distribuye uniformemente sobre los tubos de calentamiento de la calandria por medio de un sistema de distribución. La fracción líquida fluye hacia abajo en una película delgada sobre las paredes interiores de manera similar al evaporador de película descendente convencional. Los vapores formados en los tubos de la calandria se condensan como un destilado en las paredes externas de los tubos de condensado y luego fluyen hacia abajo. El destilado de agua y la fracción líquida enriquecida se descargan por separado de la parte inferior del evaporador.

Otra configuración de evaporador es el evaporador de circulación forzada. En este diseño, un separador o recipiente de calentamiento instantáneo está dispuesto por encima de una calandria y una bomba de circulación como se muestra en la figura 12. En funcionamiento, se hace circular la fracción líquida a través de la calandria por medio de una bomba de circulación. El líquido se sobrecalienta dentro de la calandria a una presión elevada mayor que la presión de ebullición normal. Al entrar en el separador, la presión se reduce rápidamente, dando como resultado

calentamiento instantáneo o ebullición rápida del líquido. La velocidad de flujo, controlada por la bomba de circulación, y las temperaturas pueden usarse para controlar el proceso de retirada de agua. Esta configuración es útil para evitar el ensuciamiento de los tubos de calandria.

5 En algunas realizaciones, pueden usarse efectos múltiples de evaporador de circulación forzada tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, además de un evaporador de circulación forzada de efecto único, pueden usarse evaporadores de circulación forzada de doble, triple y múltiple efecto en la separación de agua de la fracción líquida del líquido de fermentación. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más evaporadores de circulación forzada junto con uno o más evaporadores de película descendente.

10 En realizaciones todavía adicionales, el evaporador puede ser un evaporador de placa, tal como se muestra en la figura 13. Este evaporador usa un intercambiador de calor de placa y uno o más separadores. Una configuración de placas y bastidores usa placas con canales alternos para transportar medios de calentamiento y la fracción líquida del caldo de fermentación. En funcionamiento, se hacen pasar la fase líquida y los medios de calentamiento a través de sus respectivos canales en contracorriente. Las distancias y las formas de placa definidas generan turbulencia dando como resultado una transferencia de calor eficaz. La transferencia de calor a los canales con la fracción líquida hace que el agua hierva. El vapor así formado impulsa el líquido residual como una película ascendente al interior de un conducto de vapor del conjunto de placa. El líquido residual y los vapores se separan en el separador centrífugo aguas abajo. El amplio conducto de entrada y el movimiento ascendente ayudan a una buena distribución sobre la sección transversal del intercambiador de calor. Un evaporador de placa puede hacerse funcionar de manera útil con una filtración previa a través de una membrana de nanofiltración para evitar el ensuciamiento. Por tanto, se justifican consideraciones similares a las del evaporador de película descendente con respecto a la incrustación.

25 En algunas realizaciones, puede usarse evaporación de placa de efectos múltiples de manera muy similar a la descrita anteriormente para evaporadores de película descendente y de circulación forzada. Cuando se usa en configuraciones de efectos múltiples, un experto en la técnica reconocerá el beneficio de usar un evaporador de circulación forzada y/o una etapa de nanofiltración antes de la introducción de la fracción líquida en un evaporador de placa. Por tanto, un esquema de separación puede incluir, por ejemplo, nanofiltración, seguida por una configuración de evaporación de efectos múltiples de uno o más evaporadores de circulación forzada, seguido por uno o más de un evaporador de placa y/o de película descendente. En realizaciones todavía adicionales, también puede usarse cualquiera de los cristalizadores evaporativos descritos anteriormente junto con una configuración de efectos múltiples.

35 En algunas realizaciones, puede usarse un evaporador de circulación para retirar agua de la fracción líquida tal como se muestra en la figura 14. El evaporador de circulación utiliza una calandria vertical con una longitud de tubo corta con un separador lateral dispuesto en la parte superior del intercambiador de calor. En funcionamiento, la fracción líquida se suministra en la parte inferior de la calandria y se eleva hasta la parte superior. Durante el calentamiento en los tubos de la calandria, el agua comienza a hervir liberando vapor. El líquido se lleva a la parte superior de la calandria arrastrado por los vapores que se mueven hacia arriba. El líquido se separa de los vapores a medida que entra en el separador. El líquido fluye de nuevo al evaporador a través de una tubería de circulación para permitir la circulación continua. La mayor diferencia de temperatura entre los elementos de calentamiento de la calandria y la cámara separadora da como resultado un mayor grado de evaporación de agua de la fracción líquida. Cuando la porción líquida está lo suficientemente enriquecida en 1,4-BDO, las sales comenzarán a precipitar a partir de la fracción líquida.

50 En algunas realizaciones, el separador del evaporador de circulación puede dividirse en varias cámaras de separación cada una equipada con su propio sistema de circulación de líquidos. Esto puede reducir la superficie de calentamiento necesaria para retirar agua de la fracción líquida.

El evaporador de lecho fluidizado es aún otra configuración que puede usarse para la retirada de agua de la fracción líquida. Un sistema de este tipo, mostrado en la figura 15, está equipado con un intercambiador de calor de lecho fluidizado vertical. Sobre el lado del tubo del intercambiador de calor hay partículas sólidas tales como perlas de vidrio o cerámica, o partículas de alambre de acero.

55 El evaporador de lecho fluidizado funciona de manera similar al evaporador de circulación forzada. El movimiento hacia arriba del líquido arrastra las partículas sólidas lo que proporciona una acción de lavado o limpieza. Junto con la fracción líquida se transfieren a través de los tubos de la calandria. En la cabeza de la calandria, las partículas sólidas se separan del líquido y se recirculan a la cámara de entrada de la calandria. El fluido sobrecalentado se calienta rápidamente hasta la temperatura de ebullición en el separador permitiendo la retirada de agua mediante evaporación. La acción de lavado de los sólidos en los tubos de la calandria permite tiempos de funcionamiento prolongados y además ensuciamiento retardado de los tubos. Esto puede ser útil cuando la creación de sólidos de ensuciamiento limita el uso de sistemas convencionales de evaporador de circulación forzada.

65 El evaporador de película ascendente es aún otro tipo de evaporador útil en la retirada de agua de la fracción líquida recogida del caldo de fermentación. Esta configuración del sistema tiene un separador de vapor montado en la parte

superior en un intercambiador de calor de carcasa y tubo vertical (calandria). En funcionamiento, la fracción líquida en el fondo de la calandria se eleva a la parte superior del separador de vapor. El calentamiento externo hace que el agua de la fracción líquida hierva en las paredes interiores de los tubos de la calandria. El movimiento hacia arriba del vapor hace que la fracción líquida se lleve a la parte superior de la calandria. Durante el ascenso a través del tubo, se forma vapor adicional. Al entrar en el separador, se separan los vapores y las fases líquidas. El evaporador de película ascendente es particularmente útil cuando se usa con líquidos viscosos y/o cuando se esperan grandes cantidades de sólidos de ensuciamiento.

El evaporador de goteo a contracorriente es aún otro evaporador que puede usarse para la retirada de agua de la fracción líquida del caldo de fermentación. Este aparato tiene un intercambiador de calor de carcasa y tubo (calandria) siendo la parte inferior de la calandria mayor que la de un evaporador de película ascendente. Dispuesto en la parte superior de la calandria, como en el evaporador de película ascendente, hay un separador. En este evaporador, el separador está equipado además con un sistema de distribución de líquido.

En funcionamiento, se proporciona líquido en la parte superior del evaporador como un evaporador de película descendente. El líquido se distribuye sobre los tubos del evaporador, pero el vapor fluye hacia la parte superior a contracorriente con respecto al líquido. En algunas realizaciones, el proceso también puede incluir una corriente de un gas inerte, por ejemplo, para mejorar el arrastre. Este gas puede introducirse en la porción inferior de la calandria.

Un evaporador de agitador es aún otro tipo de evaporador que puede usarse para la retirada de agua de la fracción líquida del caldo de fermentación. Este aparato incluye un recipiente externo, calentado por camisa, equipado con un agitador. En funcionamiento, se coloca la fracción líquida en el recipiente, opcionalmente en lotes. El agua se separa por evaporación mediante ebullición con agitación continua hasta una concentración deseada. Este aparato puede aumentar su tasa de evaporación aumentando la superficie de calentamiento mediante el uso de bobinas de calentamiento por inmersión opcionales. Este tipo de evaporador es particularmente útil cuando la fermentación es altamente viscosa.

Finalmente, el evaporador de tubo en espiral es otro tipo de evaporador que puede usarse para la retirada de agua de la fracción líquida del caldo de fermentación. El diseño incluye un intercambiador de calor equipado con tubos de calentamiento en espiral y un separador centrífugo montado en el fondo. En funcionamiento, la fracción líquida hace fluir una película hirviendo de arriba abajo en flujo paralelo al vapor. Los vapores en expansión producen un efecto de cizallamiento o de empuje sobre la película líquida. La curvatura de la trayectoria de flujo induce un flujo secundario que interfiere con el movimiento a lo largo del eje del tubo. Esta turbulencia mejora la transferencia de calor y es particularmente útil con líquidos viscosos. La configuración en espiral de los tubos de calentamiento proporciona de manera útil una gran razón de área de superficie de calentamiento con respecto a la altura con respecto a un diseño de tubo recto no espiral. Este aparato proporciona grandes razones de evaporación que permiten un funcionamiento de un único pase.

Tal como se describió anteriormente, el uso de múltiples evaporadores de cualquier tipo descrito anteriormente en configuraciones de efecto doble, triple y múltiple puede aumentar la eficacia de evaporación. Otros métodos para mejorar la eficacia de funcionamiento incluyen, por ejemplo, recompresión de vapor térmica y mecánica. En algunas realizaciones, puede usarse cualquier combinación de configuraciones de efectos múltiples, recompresión térmica y recompresión mecánica para aumentar la eficacia de evaporación.

La recompresión de vapor térmica implica recomprimir el vapor desde una cámara de ebullición (o separador) hasta una presión más alta. La temperatura de vapor saturado correspondiente a la presión de la cámara de calentamiento es mayor de modo que el vapor puede reutilizarse para el calentamiento. Esto se consigue con un compresor de vapor de chorro de vapor que funciona basándose en el principio de la bomba de chorro de vapor. En resumen, el principio del chorro de vapor utiliza la energía del vapor para crear vacío y gestionar gases de proceso. El vapor a presión entra en una boquilla y produce un chorro de alta velocidad. Esta acción de chorro crea un vacío que atrae y arrastra el gas. La mezcla de vapor y gas se descarga a presión atmosférica. Una cantidad de vapor, denominado vapor motriz, se utiliza para hacer funcionar el compresor térmico. El vapor motriz se transfiere al siguiente efecto o a un condensador. La energía del exceso de vapor es aproximadamente la de la cantidad de vapor motriz usada.

En evaporadores de efectos múltiples equipados con compresores de vapor térmicos, el medio de calentamiento en la primera calandria es el vapor de producto de uno de los efectos asociados, comprimido hasta un nivel de temperatura mayor por medio de un eyector de vapor. El medio de calentamiento en cualquier efecto posterior es el vapor generado en la calandria anterior. El vapor del efecto final se condensa con el producto entrante, complementado opcionalmente con agua de refrigeración según sea necesario. Toda el agua recuperada se recircula fácilmente a un caldo de fermentación.

Los compresores mecánicos utilizan todo el vapor que abandona un evaporador. El vapor se recomprime hasta la presión de la temperatura de vapor de calentamiento correspondiente del evaporador. El principio de funcionamiento es similar a una bomba de calor. La energía del condensado de vapor puede usarse opcionalmente para precalentar porciones adicionales de la fracción líquida del caldo de fermentación. La recompresión mecánica se suministra mediante el uso de ventiladores de alta presión o turbocompresores. Estos ventiladores funcionan a alta velocidad y

son adecuados para altas velocidades de flujo a razones de compresión de vapor de aproximadamente 1:1,2 a aproximadamente 1:2. Las velocidades racionales pueden ser de entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 18.000 rpm. En algunas realizaciones, cuando son útiles presiones particularmente altas, pueden usarse compresores de fases múltiples.

En los evaporadores equipados con recompresores de vapor mecánicos, el medio de calentamiento en el primer efecto es vapor desarrollado en el mismo efecto, comprimido hasta una temperatura mayor por medio de un ventilador de alta presión. Cualquier exceso de vapor procedente de la sección de calor elevado se condensa opcionalmente o puede utilizarse en un concentrador alto.

Tal como se describió anteriormente, existen muchos tipos de evaporación posibles que pueden disponerse en diversas configuraciones con eficiencia energética, incluyendo efectos múltiples, recompresión de vapor térmica, recompresión de vapor mecánica o combinaciones de las mismas. Las configuraciones óptimas dependen de muchos factores, incluyendo, por ejemplo, si las sales de medios se retiran antes de la evaporación o mediante cristalización durante la evaporación. Para el caso en el que las sales se retiran antes de la evaporación, son útiles configuraciones de bajo coste. Las configuraciones a modo de ejemplo incluyen un sistema de evaporador de efecto triple de película descendente o un sistema de recompresión de vapor mecánica. El caso en el que las sales se cristalizan durante la evaporación es más complejo debido a la posibilidad de incrustaciones en las superficies del intercambiador de calor por precipitación de las sales. Una configuración a modo de ejemplo para este caso incluye efecto triple en el que los dos primeros efectos son evaporadores de película descendente (antes del inicio de la cristalización) y la etapa final es un cristizador evaporativo de circulación forzada, por ejemplo.

La purificación de 1,4-BDO, en particular, puede producirse en una serie de dos columnas de destilación, aunque pueden usarse más. Se usa una primera columna para separar agua y otros componentes ligeros de 1,4-BDO, mientras que se usa una segunda columna para destilar el 1,4-BDO de cualquier componente pesado residual. Las columnas de destilación pueden hacerse funcionar a vacío para reducir las temperaturas requeridas y reducir reacciones no deseadas, degradación del producto y formación de color. La disminución de presión a lo largo de las columnas puede minimizarse para mantener bajas temperaturas en el hervidor inferior. El tiempo de residencia en el hervidor puede minimizarse para prevenir también reacciones no deseadas, degradación del producto y formación de color, usando, por ejemplo, un hervidor de película descendente.

Los expertos en la técnica reconocerán que diversas configuraciones de los aparatos de centrifugación, filtración, intercambio iónico, cristizador de evaporador, evaporador y destilación indicados son útiles en la purificación de 1,4-BDO. Una configuración a modo de ejemplo incluye, por ejemplo, centrifugación de discos, ultrafiltración, cristalización evaporativa, intercambio iónico y destilación tal como se muestra en el diagrama de esquema de flujo de la figura 16. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de aislamiento de 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación que incluye retirar una porción de sólidos mediante centrifugación de discos para proporcionar una fracción líquida, retirar una porción adicional de sólidos de la fracción líquida mediante ultrafiltración, retirar una porción de sales de la fracción líquida mediante cristalización evaporativa, retirar una porción adicional de sales de la fracción líquida mediante intercambio iónico y destilar 1,4-BDO.

Tal como se muestra en la figura 16, en primer lugar se retiran células y sólidos mediante centrifugación de discos. Las células pueden recircularse opcionalmente de nuevo en la fermentación. La ultrafiltración retira residuos celulares, ADN y proteínas precipitadas. La cristalización evaporativa retira una porción de las sales de medios y agua, cualquiera de los cuales puede recircularse opcionalmente de nuevo en la fermentación. Tras la cristalización evaporativa, se hace pasar la fase líquida restante a través de una columna de intercambio iónico para retirar sales adicionales. Tras el intercambio iónico, una porción del agua puede evaporarse en un sistema de evaporador, tal como se describió anteriormente. La destilación de la fracción ligera va seguida por destilación de 1,4-BDO para proporcionar 1,4-BDO sustancialmente puro.

Otra configuración a modo de ejemplo incluye centrifugación de discos, ultrafiltración, nanofiltración, intercambio iónico, evaporación y destilación, tal como se muestra en la figura 17. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para aislar 1,4-BDO a partir de un caldo de fermentación que incluye retirar una porción de sólidos mediante centrifugación de discos para proporcionar una fracción líquida, retirar una porción adicional de sólidos de la fracción líquida mediante ultrafiltración, retirar una porción de sales de la fracción líquida mediante nanofiltración, retirar una porción adicional de sales de la fracción líquida mediante intercambio iónico, evaporar una porción de agua y destilar 1,4-BDO.

Tal como se muestra en la figura 17, en primer lugar se retiran células y sólidos mediante centrifugación de discos. Las células pueden recircularse opcionalmente de nuevo en la fermentación. La ultrafiltración retira residuos celulares, ADN y proteínas precipitadas. La nanofiltración retira una porción de las sales de medios, que puede recircularse opcionalmente de nuevo en la fermentación. Tras la nanofiltración, se hace pasar el permeado a través de una columna de intercambio iónico para retirar sales adicionales. Tras el intercambio iónico, una porción del agua puede evaporarse en un sistema de evaporador, tal como se describió anteriormente. La destilación de la fracción ligera va seguida por destilación de 1,4-BDO para proporcionar 1,4-BDO sustancialmente puro.

El compuesto de interés puede ser cualquier compuesto para el cual el producto puede diseñarse mediante ingeniería para la biosíntesis en un microorganismo. Los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden aplicar a compuestos de interés que tienen puntos de ebullición mayores que el agua. Específicamente, los compuestos de interés pueden tener un punto de ebullición de entre aproximadamente 120°C y 400°C. Otras propiedades incluyen alta solubilidad o miscibilidad en agua y la incapacidad de solubilizar de manera apreciable sales (cuando se emplea cristalización evaporativa), y compuestos neutros con pesos moleculares por debajo de aproximadamente 100-150 Dalton (para idoneidad con la nanofiltración).

Los procedimientos y principios descritos en el presente documento pueden aplicarse para aislar un compuesto de interés de un caldo de fermentación, en el que el compuesto de interés tiene las propiedades generales descritas anteriormente. Un procedimiento de este tipo incluye separar una fracción líquida enriquecida en el compuesto de interés de una fracción sólida que incluye la masa celular, seguido por retirada de agua y sal, seguido por purificación.

En algunas realizaciones, la invención también proporciona un procedimiento para recircular componentes de un caldo de fermentación. El caldo de fermentación puede incluir 1,4-BDO como compuesto de interés que tiene un punto de ebullición mayor que el agua, células capaces de producir 1,4-BDO o el compuesto de interés, sales de medios y agua. El procedimiento incluye separar una fracción líquida enriquecida en 1,4-BDO de una fracción sólida que incluye las células. Entonces se recirculan las células en el caldo de fermentación. El agua puede retirarse antes o después de la separación de sales de la fracción líquida. El agua evaporada de la fracción líquida se recircula en el caldo de fermentación. Pueden retirarse sales de la fracción líquida y recircularse en el caldo de fermentación o bien mediante retirada de agua de la fracción líquida, haciendo que las sales cristalicen, o bien mediante nanofiltración y/o intercambio iónico. Las sales separadas de la nanofiltración se recirculan entonces en el caldo de fermentación. El procedimiento proporciona 1,4-BDO que puede purificarse adicionalmente mediante, por ejemplo, destilación.

En algunas realizaciones, un procedimiento para producir 1,4-BDO, incluye cultivar un microorganismo que produce el compuesto en un fermentador durante un periodo de tiempo suficiente para producir el compuesto de interés. El organismo incluye un microorganismo que tiene una ruta de compuesto que comprende uno o más genes exógenos que codifican para una enzima de ruta de compuesto y/o una o más inactivaciones génicas. El procedimiento para producir el compuesto también incluye aislar el compuesto mediante un procedimiento que incluye separar una fracción líquida enriquecida en compuesto de interés de una fracción sólida que comprende células, retirar agua de la fracción líquida, retirar sales de la fracción líquida y purificar el compuesto de interés. El compuesto de interés tiene un punto de ebullición mayor que el agua.

En una realización específica, un procedimiento para producir 1,4-BDO incluye cultivar un microorganismo que produce 1,4-BDO en un fermentador durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-BDO. El organismo incluye un microorganismo que tiene una ruta de 1,4-BDO que incluye uno o más genes exógenos que codifican una enzima de ruta de compuesto y/o una o más inactivaciones génicas. El procedimiento para producir 1,4-BDO también incluye aislar el compuesto mediante un procedimiento que incluye separar una fracción líquida enriquecida en compuesto de interés de una fracción sólida que comprende células, retirar agua de la fracción líquida, retirar sales de la fracción líquida, y purificar el compuesto de interés.

Según la invención, cuando el producto de interés es 1,4-BDO, la producción comienza con el cultivo de un organismo microbiano capaz de producir 1,4-BDO mediante un conjunto de enzimas de ruta de 1,4-BDO. Los organismos microbianos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, los descritos en el documento U.S. 2009/0075351 y el documento U.S. 2009/0047719.

Pueden proporcionarse organismos que incorporen uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas en una ruta de 1,4-BDO. Tales organismos incluyen, por ejemplo, organismos microbianos que no se producen de manera natural diseñados mediante ingeniería genética para tener una ruta biosintética completa de 1,4-BDO. Tales rutas pueden incluir enzimas codificadas tanto por ácidos nucleicos endógenos como exógenos. Las enzimas que no están normalmente presentes en un huésped microbiano pueden añadir funcionalidad para completar una ruta incluyendo, por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos exógenos. Una de tales rutas de 1,4-BDO incluye enzimas que codifican una 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, una 4-hidroxiutirato:CoA-transferasa, una 4-butirato-cinasa, una fosfotransbutirilasa, una α -cetoglutarato descarboxilasa, una aldehído deshidrogenasa, una alcohol deshidrogenasa o una aldehído/alcohol deshidrogenasa.

Otra ruta puede incluir uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una 4-aminobutirato CoA transferasa, una 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, una 4-aminobutirato-CoA ligasa, una 4-aminobutiril-CoA oxidoreductasa (desaminación), un 4-aminobutiril-CoA transaminasa o una 4-hidroxiutiril-CoA deshidrogenasa. Una ruta de este tipo puede incluir además una 4-hidroxiutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), una 4-hidroxiutiril-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Todavía otra ruta puede incluir uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una 4-aminobutirato CoA transferasa, una 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, una 4-aminobutirato-CoA ligasa, una 4-aminobutiril-CoA reductasa

incluir uno o más genes seleccionados del conjunto de genes que incluyen *mgo*, *aspA*, *sfcA*, *maeB*, *pntAB* y *gdhA*. Todavía otras inactivaciones pueden incluir uno o más genes seleccionados del conjunto de genes que incluyen *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*, *prpC* y *gsk*. Todavía otras inactivaciones pueden incluir la inactivación de *pflAB*. Un conjunto de inactivaciones a modo de ejemplo puede incluir uno o más genes seleccionados del conjunto de genes que comprenden *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh* y *aspA*, incluyendo inactivación de cada uno de los genes *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh* y *aspA*.

Los conjuntos de inactivaciones a modo de ejemplo adicionales incluyen *adhE*, *nadh6*; *adhE*, *ppck*; *adhE*, *sucd4*; *adhE*, *atps4r*; *adhE*, *fum*; *adhE*, *mdh*; *adhE*, *pflI*, *ppck*; *adhE*, *pflI*, *sucd4*; *adhE*, *ackr*, *nadh6*; *adhE*, *nadh6*, *pflI*; *adhE*, *aspt*, *mdh*; *adhE*, *nadh6*, *ppck*; *adhE*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *ppck*; *adhE*, *mdh*, *thd2*; *adhE*, *fum*, *pflI*; *adhE*, *ppck*, *sucd4*; *adhE*, *glcpts*, *ppck*; *adhE*, *gludy*, *mdh*; *adhE*, *gludy*, *ppck*; *adhE*, *fum*, *ppck*; *adhE*, *mdh*, *ppck*; *adhE*, *fum*, *gludy*; *adhE*, *fum*, *hex1*; *adhE*, *hex1*, *pflI*; *adhE*, *hex1*, *thd2*; *adhE*, *frd2*, *ldh_d*, *mdh*; *adhE*, *frd2*, *ldh_d*, *me2*; *adhE*, *mdh*, *pgl*, *thd2*; *adhE*, *g6pdhy*, *mdh*, *thd2*; *adhE*, *pflI*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *ackr*, *akgd*, *atps4r*, *adhE*, *glcpts*, *pflI*, *ppck*; *adhE*, *ackr*, *atps4r*, *sucoas*; *adhE*, *gludy*, *pflI*, *ppck*; *adhE*, *me2*, *pflI*, *sucd4*; *adhE*, *gludy*, *pflI*, *sucd4*; *adhE*, *atps4r*, *ldh_d*, *sucd4*; *adhE*, *fum*, *hex1*, *pflI*; *adhE*, *mdh*, *nadh6*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *nadh6*; *adhE*, *atps4r*, *fum*, *nadh6*; *adhE*, *aspt*, *mdh*, *nadh6*; *adhE*, *aspt*, *mdh*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *glcpts*, *sucd4*; *adhE*, *atps4r*, *gludy*, *mdh*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *ppck*; *adhE*, *atps4r*, *fum*, *ppck*; *adhE*, *aspt*, *glcpts*, *mdh*; *adhE*, *aspt*, *gludy*, *mdh*; *adhE*, *me2*, *sucd4*, *thd2*; *adhE*, *fum*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *mdh*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *gludy*, *mdh*, *thd2*; *adhE*, *hex1*, *pflI*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *g6pdhy*, *mdh*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *pgl*; *adhE*, *ackr*, *frd2*, *ldh_d*; *adhE*, *ackr*, *ldh_d*, *sucd4*; *adhE*, *atps4r*, *fum*, *gludy*; *adhE*, *atps4r*, *fum*, *hex1*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *frd2*, *ldh_d*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *pgdh*; *adhE*, *glcpts*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *gludy*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *fum*, *hex1*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *me2*, *thd2*; *adhE*, *fum*, *me2*, *thd2*; *adhE*, *glcpts*, *gludy*, *ppck*; *adhE*, *me2*, *pgl*, *thd2*; *adhE*, *g6pdhy*, *me2*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *frd2*, *ldh_d*, *me2*; *adhE*, *atps4r*, *frd2*, *ldh_d*, *mdh*; *adhE*, *aspt*, *ldh-d*, *mdh*, *pflI*; *adhE*, *atps4r*, *glcpts*, *nadh6*, *pflI*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *nadh6*, *pgl*; *adhE*, *atps4r*, *g6pdhy*, *mdh*, *nadh6*; *adhE*, *ackr*, *fum*, *gludy*, *ldh_d*; *adhE*, *ackr*, *gludy*, *ldh_d*, *sucd4*; *adhE*, *atps4r*, *g6pdhy*, *mdh*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *mdh*, *pgl*, *thd2*; *adhE*, *aspt*, *g6pdhy*, *mdh*, *pyk*; *adhE*, *aspt*, *mdh*, *pgl*, *pyk*; *adhE*, *aspt*, *ldh_d*, *mdh*, *sucoas*; *adhE*, *aspt*, *fum*, *ldh_d*, *mdh*; *adhE*, *aspt*, *ldh_d*, *mals*, *mdh*; *adhE*, *aspt*, *icl*, *ldh_d*, *mdh*; *adhE*, *frd2*, *gludy*, *ldh_d*, *ppck*; *adhE*, *frd2*, *ldh_d*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *ackr*, *atps4r*, *ldh_d*, *sucd4*; *adhE*, *ackr*, *acs*, *ppc*, *ppck*; *adhE*, *gludy*, *ldh_d*, *ppc*, *ppck*; *adhE*, *ldh_d*, *ppc*, *ppck*, *thd2*; *adhE*, *aspt*, *atps4r*, *glcpts*, *mdh*; *adhE*, *g6pdhy*, *mdh*, *nadh6*, *thd2*; *adhE*, *mdh*, *nadh6*, *pgl*, *thd2*; *adhE*, *atps4r*, *g6pdhy*, *glcpts*, *mdh*; *adhE*, *atps4r*, *glcpts*, *mdh*, *pgl*; y *adhE*, *ackr*, *ldh_d*, *mdh*, *sucd4*. Los genes mencionados anteriormente se incluyen en una lista más amplia de candidatos de desactivación, junto con las reacciones que catalizan estos genes, en la tabla 1a a continuación.

Tabla 1a. Candidatos de desactivación de genes en *E. coli*.

Abreviatura de la reacción	Estequiometría de la reacción*	Genes que codifican la(s) enzima(s) que cataliza(n) cada reacción&
ACKr	[c] : ac + atp <=> actp + adp	(b3115 o b2296 o b1849)
ACS	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <=> ac[c] + h[c]	No asociada a genes
ADHER	[c] : etoh + nad <=> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <=> accoa + h + nadh	(b0356 o b1478 o b1241) (b1241 o b0351)
AKGD	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 y b0726 y b0727)
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <=> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735)) o ((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735) y b3739))
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <=> adp + cbp + (2) h	(b0521 o b0323 o b2874)
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c] : 2pg <=> h2o + pep	b2779
FBA	[c] : fdp <=> dhap + g3p	(b2097 o b2925 o b1773)
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 o b3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 y b3893 y b3894) o (b1474 y b1475 y b1476))
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmq18 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 y b4152 y b4153 y b4154)
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c] : fum + h2o <=> mal-L	(b1612 o b4122 o b1611)
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <=> 6pgl + h + nadph	b1852

ES 2 625 623 T3

GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 y b1101 y b2415 y b2416) o (b1817 y b1818 y b1819 y b2415 y b2416) o (b2417 y b1621 y b2415 y b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akglu + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 y b2903 y b2905 y b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133 o b1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 o b2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + metf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmq18 + nad	b1109
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmq18[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 y b2277 y b2278 y b2279 y b2280 y b2281 y b2282 y b2283 y b2284 y b2285 y b2286 y b2287 y b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 o b1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 y b0903) y b2579) o (b0902 y b0903) o (b0902 y b3114) o (b3951 y b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612 o b4395 o b0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PROIz	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854 o b1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	No asociada a genes
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 o b3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241 o b0929 o b1377 o b2215)
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 y b0722 y b0723 y b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 y b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 y b2425 y b2424 y b2423) o (b0763 y b0764 y b0765) o (b2422 y b2424 y b2423 y b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 o b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 y b1603)
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 o (b1602 y b1603))
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919

Las abreviaturas para los metabolitos en la tabla 1a se muestran a continuaci3n en la tabla 1b.

Tabla 1b. Nombres de metabolitos correspondientes a las abreviaturas usadas en la tabla 1a.

Abreviatura del metabolito	Nombre del metabolito
10fthf	10-formiltetrahidrofolato
1pyr5c	1-pirrolina-5-carboxilato
2ddg6p	2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato 6-fosfato
2dmmq8	2-desmetilmenaquinona 8
2dmmq18	2-desmetilmenaquinol 8
2pg	D-glicerato 2-fosfato
3pg	3-fosfo-D-glicerato
6pgc	6-fosfo-D-gluconato

ES 2 625 623 T3

6pgl	6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona
ac	Acetato
acald	Acetaldehído
accoa	Acetil-CoA
actp	Acetilfosfato
adp	ADP
akg	2-oxoglutarato
amp	AMP
asn-L	L-asparagina
asp-L	L-aspartato
atp	ATP
cbp	Carbamoil fosfato
co2	CO ₂
coa	Coenzima A
dhap	Dihidroxiacetona fosfato
e4p	D-eritrosa 4-fosfato
etoh	Etanol
f6p	D-fructosa 6-fosfato
fad	Flavina adenina dinucleótido oxidada
fadh2	Flavina adenina dinucleótido reducida
fdp	D-fructosa 1,6-bisfosfato
for	Formiato
fum	Fumarato
g3p	Gliceraldehído 3-fosfato
g6p	D-glucosa 6-fosfato
glc-D	D-glucosa
glu5p	L-glutamato 5-fosfato
glu5sa	L-glutamato 5-semialdehído
glu-L	L-glutamato
glx	Glioxilato
gly	Glicina
h	H ⁺
h2o	H ₂ O
icit	Isocitrato
lac-D	D-lactato
mal-L	L-malato
methf	5,10-metilenitetrahydrofolato
mlthf	5,10-metilenetetrahydrofolato
mql8	Menaquinol 8
mqn8	Menaquinona 8
nad	Nicotinamida adenina dinucleótido
nadh	Nicotinamida adenina dinucleótido - reducida
nadp	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nadph	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - reducida
nh4	Amonio
oaa	Oxaloacetato
pep	Fosfoenolpiruvato
pi	Fosfato
ppi	Difosfato
pro-L	L-prolina
pyr	Piruvato
q8	Ubiquinona-8
q8h2	Ubiquinol-8
ru5p-D	D-ribulosa 5-fosfato
s7p	Sedoheptulosa 7-fosfato
so4	Sulfato
succ	Succinato
succoa	Succinil-CoA
thf	5,6,7,8-tetrahydrofolato
xu5p-D	D-xilulosa 5-fosfato

Cualquier microorganismo que no se produce de manera natural que incorpora cualquier combinación de las

5 inactivaciones génicas anteriores también puede incluir una inserción génica de al menos un ácido nucleico exógeno. Cualquiera de las rutas de inserción génica descritas anteriormente puede integrarse con inactivaciones génicas. Por ejemplo, una ruta que incluye inactivaciones de los genes *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh* y *aspA* también puede incluir la inserción de una 4-hidroxitbutanoato deshidrogenasa, una semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, una succinil-CoA sintetasa, una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, una 4-hidroxitbutirato:CoA transferasa, una glutamato:semialdehído succínico transaminasa, una glutamato descarboxilasa, una aldehído deshidrogenasa independiente de CoA, una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o una alcohol deshidrogenasa. La tabla 2 a continuación resume organismos diseñados por ingeniería genética a modo de ejemplo para la producción de 1,4-BDO que incorporan combinaciones de inactivación génica e inserción génica. Obsérvese que la inserción génica puede ser en forma de inserción cromosómica o proporcionando un plásmido.

Tabla 2. Diseños de combinación de inactivación-inserción para la producción de 1,4-BDO

nº de cepa	Cromosoma huésped	Descripción del huésped	A base de plásmido
1	$\Delta ldhA$	Derivado de delección única de <i>E. coli</i> MG1655	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
2	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$	Cepa productora de succinato; derivado de <i>E. coli</i> MG1655	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
3	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$	Mejora de <i>lpdA</i> para aumentar el flujo de piruvato deshidrogenasa	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
4	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$		sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , <i>buk1</i> de <i>C. acetobutylicum</i> , <i>ptb</i> de <i>C. acetobutylicum</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
5	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$	Delecciones en <i>mdh</i> y <i>arcA</i> para dirigir el flujo a través del ciclo oxidativo de los ácidos tricarbóxicos(TCA)	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
6	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$		sucA de <i>M. bovis</i> , sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
7	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR163L</i>	Mutación en citrato sintasa para mejorar la actividad anaerobia	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
8	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR163L</i>		sucA de <i>M. bovis</i> , sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
9	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR163L</i>		sucA de <i>M. bovis</i> , sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
10	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR163L</i> <i>fimD::</i> sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i>	Ramificación de succinato de la ruta anterior integrada en ECKh-422	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
11	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR163L</i> <i>fimD::</i> sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD::</i> sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluyveri</i>	Ramificaciones de succinato y alfacetoglutarato de las rutas anteriores integradas en ECKh-422	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
12	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR163L</i> <i>fimD::</i> sucCD de <i>E. coli</i> ,		<i>buk1</i> de <i>C. acetobutylicum</i> , <i>ptb</i> de <i>C. acetobutylicum</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>

	sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluyveri</i>		
13	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L$ $\Delta ackA \Delta fimD:: sucCD$ de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P.</i> <i>gingivalis</i> , 4hbd de <i>P.</i> <i>gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C.</i> <i>kluyveri</i>	Delección de acetato cinasa de ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
14	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L$ $\Delta ackA \Delta ppc::H.i.ppc$ <i>fimD</i> :: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluyveri</i>	Delección de acetato cinasa y sustitución de PPC/PEPCK de ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
15	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::fnr-pflB6-$ $K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta fimD::$ sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C.</i> <i>kluyveri</i>	Sustitución del promotor de lpdA por un promotor anaerobio en ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
16	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA:: K.p.lpdA322$ $\Delta pdhR:: fnr-pflB6 \Delta mdh$ $\Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta fimD::$ sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C.</i> <i>kluyveri</i>	Sustitución del promotor de pdhR y aceEF por un promotor anaerobio en ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
17	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA:: K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L$ <i>fimD</i> :: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluyveri</i> <i>fimD</i> :: <i>buk1</i> de <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> , <i>ptb</i> de <i>C. acetobutylicum</i>	Integración de BK/PTB en ECKh-432	Ald de <i>C. beijerinckii</i>
18	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA:: K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L$ <i>fimD</i> :: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluyveri</i> <i>fimD</i> :: <i>buk1</i> de <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> , <i>ptb</i> de <i>C. acetobutylicum</i>		Ald de <i>C. beijerinckii</i> , adh1 de <i>G.</i> <i>thermoglucoasidasius</i>
19	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ $\Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L$	Genes de sacarosa distintos de PTS insertados en ECKh- 432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>

	<i>fimD</i> :: <i>sucCD</i> de <i>E. coli</i> , <i>sucD</i> de <i>P. gingivalis</i> , <i>4hbd</i> de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: <i>sucA</i> de <i>M. bovis</i> , <i>4hbd</i> de <i>C. kluyveri</i> <i>rrnC</i> :: <i>cscAKB</i>		
20	Δ <i>adhE</i> Δ <i>ldhA</i> Δ <i>pflB</i> Δ <i>lpdA</i> ::K.p. <i>lpdA322</i> Δ <i>mdh</i> Δ <i>arcA</i> <i>gltAR163L</i> <i>fimD</i> :: <i>sucCD</i> de <i>E. coli</i> , <i>sucD</i> de <i>P. gingivalis</i> , <i>4hbd</i> de <i>P. gingivalis</i> <i>fimD</i> :: <i>sucA</i> de <i>M. bovis</i> , <i>4hbd</i> de <i>C. kluyveri</i> <i>rrnC</i> :: <i>cscAKB</i>		<i>buk1</i> de <i>C. acetobutylicum</i> , <i>ptb</i> de <i>C. acetobutylicum</i> , <i>Ald</i> de <i>C. beijerinckii</i>

*El símbolo delta (Δ) indica delección génica.

- 5 Las cepas resumidas en la tabla 2 son tal como sigue: Cepa 1: Derivado de delección única de *E. coli* MG1655, con delección de *ldhA* endógeno; expresión de plásmido de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*. Cepa 2: Cepa huésped AB3, una cepa productora de succinato, derivado de *E. coli* MG1655, con delecciones de *adhE* *ldhA* *pflB* endógenos; expresión de plásmido de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*.
- 10 Cepa 3: Cepa huésped ECKh-138, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*; expresión de plásmido de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*; la cepa proporciona una mejora de *lpdA* para aumentar el flujo de piruvato deshidrogenasa. Cepa 4: Cepa huésped ECKh-138, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* y *lpdA* endógenos, inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys; expresión de plásmido de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *buk1* de *C. acetobutylicum*, *ptb* de *C. acetobutylicum*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*.
- 15 Cepa 5: Cepa huésped ECKh-401, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *Klebsiella pneumoniae* *lpdA* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos; expresión de plásmido de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*; la cepa tiene delecciones en *mdh* y *arcA* para dirigir el flujo a través del ciclo oxidativo de TCA. Cepa 6: cepa huésped ECKh-401, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *Klebsiella pneumoniae* *lpdA* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos; expresión de plásmido de *sucA* de *M. bovis*, *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*.
- 20 Cepa 7: Cepa huésped ECKh-422, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*; expresión de plásmido de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*; la cepa tiene una mutación en citrato sintasa para mejorar la actividad anaerobia. Cepa 8: cepa ECKh-422, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*; expresión de plásmido de *sucA* de *M. bovis*, *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *AdhE2* de *C. acetobutylicum*. Cepa 9: cepa huésped ECKh-422, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*; expresión de plásmido de *sucA* de *M. bovis*, *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, *Cat2* de *P. gingivalis*, *Ald* de *C. beijerinckii*.
- 30 Cepa 10: cepa huésped ECKh-426, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*; expresión de plásmido de *Cat2* de *P. gingivalis*, *Ald* de *C. beijerinckii*; la cepa tiene ramificación de succinato de la ruta anterior integrada en la cepa ECKh-422 en el locus de *fimD*. Cepa 11: cepa huésped ECKh-432, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*; expresión de plásmido de *Cat2* de *P. gingivalis*, *Ald* de *C. beijerinckii*; la cepa tiene ramificaciones de succinato y alfa-
- 35
- 40
- 45
- 50

5 cetoglutarato de las rutas anteriores integradas en ECKh-422. Cepa 12: cepa huésped ECKh-432, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*; expresión de plásmido de *buk1* de *C. acetobutylicum*, *ptb* de *C. acetobutylicum*, Ald de *C. beijerinckii*.

10 Cepa 13: cepa huésped ECKh-439, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, delección de *ackA* endógeno, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*; expresión de plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene delección de acetato cinasa en la cepa ECKh-432. Cepa 14: cepa huésped ECKh-453, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, delección de *ackA* endógeno, delección de *ppc* endógeno y inserción de *ppck* de *Haemophilus influenzae* en el locus de *ppc*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*; expresión de plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene delección de acetato cinasa y sustitución de PPC/PEPCK en la cepa ECKh-432.

25 Cepa 15: cepa huésped ECKh-456, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*, sustitución del promotor de *lpdA* con sitio de unión de *fnr*, promotor de *pflB-p6* y RBS de *pflB*; expresión de plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene un sustitución del promotor de *lpdA* por un promotor anaerobio en la cepa ECKh-432. Cepa 16: cepa huésped ECKh-455, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*, sustitución del promotor de *pdhR* y *aceEF* con sitio de unión de *fnr*, promotor de *pflB-p6* y RBS de *pflB*; expresión de plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene una sustitución del promotor de *pdhR* y *aceEF* por un promotor anaerobio en ECKh-432.

40 Cepa 17: cepa huésped ECKh-459, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *buk1* de *C. acetobutylicum*, *ptb* de *C. acetobutylicum*; expresión de plásmido de Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene una integración de BK/PTB en la cepa ECKh-432. Cepa 18: cepa huésped ECKh-459, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *buk1* de *C. acetobutylicum*, *ptb* de *C. acetobutylicum*; expresión de plásmido de Ald de *C. beijerinckii*, *adh1* de *G. thermoglucosidasius*.

55 Cepa 19: cepa huésped ECKh-463, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*, inserción en el locus de *rrnC* de operón de sacarosa distinto de PTS de genes de sacarosa permeasa (*cscB*), D-fructocinasa (*cscK*), sacarosa hidrolasa (*cscA*), y un represor específico de sacarosa relacionado con LacI (*cscR*); expresión de plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene genes de sacarosa distintos de PTS insertados en la cepa ECKh-432. Cepa 20: cepa huésped ECKh-463, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección de *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación de Glu354Lys en el locus de *lpdA*, delección de *mdh* y *arcA* endógenos, sustitución cromosómica de *gltA* por mutante Arg163Leu de *gltA*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus de *fimD* de *sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*, inserción en el locus de *rrnC* de operón de sacarosa distinto de PTS; expresión de plásmido de *buk1* de *C. acetobutylicum*, *ptb* de *C. acetobutylicum*, Ald de *C. beijerinckii*.

Las cepas diseñadas por ingeniería genética para el uso de sacarosa mediante un sistema de fosfotransferasa (PTS) producen cantidades significativas de piruvato como un subproducto. Por tanto, el uso de un sistema de sacarosa distinto de PTS puede usarse para disminuir la formación de piruvato debido a que el importe de sacarosa no estaría acompañado por la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato. Esto aumentará la reserva de PEP y el flujo a oxaloacetato a través de PPC o PEPCK.

Puede realizarse la inserción de un operón de sacarosa distinto de PTS en la región de *rrnC*. Para generar un producto de PCR que contiene los genes de sacarosa distintos de PTS flanqueados por regiones de homología con respecto a la región de *rrnC*, se usan dos oligos para amplificar mediante PCR los genes *csc* de Mach1™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta cepa es un descendiente de la cepa W que es una cepa de *E. coli* conocida por ser capaz de catabolizar sacarosa (Orencio-Trejo *et al.*, *Biotechnology Biofuels* 1:8 (2008)). La secuencia se derivó a partir de la cepa W de *E. coli* KO11 (registro AY314757) (Shukla *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 26:689-693 (2004)) e incluye genes que codifican una sacarosa permeasa (*cscB*), D-fructocinasa (*cscK*), sacarosa hidrolasa (*cscA*), y un represor específico de sacarosa relacionado con *Lacl* (*cscR*). Los primeros 53 aminoácidos de *cscR* se retiraron eficazmente mediante la colocación del cebador. Tras la purificación, el producto de PCR se introduce mediante electroporación en células electrocompetentes MG1655 que se habían transformado con pRedET (tet) y preparado según las instrucciones del fabricante (www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf). El producto de PCR está diseñado de manera que se integra en el genoma en la región de *rrnC* del cromosoma. Deleciona eficazmente 191 nucleótidos aguas arriba de *rrlC* (23S ARNr), todo el gen de ARNr de *rrlC* y 3 nucleótidos aguas abajo de *rrlC* y lo sustituye por el operón de sacarosa. Toda la región de *rrnC::cscAKB* se transfiere en la cepa huésped ECKh-432 de BDO por transducción P1 (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001), dando como resultado ECKh-463 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L } fimD::sucCD$ de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis* *fimD::sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri* *rrnC::cscAKB*). Los recombinantes se seleccionan por el crecimiento en sacarosa y se verifican con PCR de diagnóstico.

Antes de cultivar los organismos que producen el compuesto o que producen 1,4-BDO, la materia prima de los materiales de partida tal como jarabe de sacarosa y los componentes de medios pueden tratarse, por ejemplo, mediante esterilización con calor antes de la adición al biorreactor de producción para eliminar cualquier contaminante biológico. Según algunas realizaciones, la materia prima puede incluir, por ejemplo, sacarosa o glucosa para la fermentación de BDO. En algunas realizaciones, la materia prima puede incluir gas de síntesis. Los componentes de medios adicionales usados para fomentar el crecimiento de los microorganismos incluyen, por ejemplo, sales, fuentes de nitrógeno, tampones, metales traza y una base para control del pH. Los principales componentes de un paquete de medios a modo de ejemplo, expresados en g/l de caldo de fermentación, se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3

Categoría	Concentración	
Fuente de N	3	g/l
Tampón	5	g/l
Sales	0,65	g/l
Base	1,4	g/l
	10,1	g/l

El tipo de fuente de carbono puede variar considerablemente y puede incluir glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltodextrinas, almidón, inulina, glicerol, aceites vegetales tales como aceite de soja, hidrocarburos, alcoholes tales como metanol y etanol, ácidos orgánicos tales como acetato, gas de síntesis, y combinaciones similares de CO, CO₂ y H₂. El término "glucosa" incluye jarabes de glucosa, es decir, composiciones de glucosa que comprenden oligómeros de glucosa. El material de biomasa vegetal o derivado de plantas puede ser una fuente de materia prima de bajo coste. Tal materia prima puede incluir, por ejemplo, maíz, sojas, algodón, linaza, colza, caña de azúcar y aceite de palma. La biomasa puede someterse a hidrólisis enzimática o química para liberar sustratos que pueden procesarse adicionalmente mediante biocatálisis para producir productos químicos de interés. Estos sustratos incluyen mezclas de carbohidratos, así como compuestos aromáticos y otros productos que se derivan conjuntamente de las porciones celulósicas, hemicelulósicas y de lignina de la biomasa. Los carbohidratos generados a partir de la biomasa son una mezcla rica de azúcares de 5 y 6 carbonos que incluyen, por ejemplo, sacarosa, glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y fructosa.

La fuente de carbono puede añadirse al cultivo como un sólido, líquido o gas. La fuente de carbono puede añadirse de manera controlada para evitar tensión sobre las células debido a sobrealimentación. A este respecto, los cultivos semicontinuo y continuo son modos de cultivo útiles tal como se estudia adicionalmente a continuación.

El tipo de fuente de nitrógeno puede variar considerablemente y puede incluir urea, hidróxido de amonio, sales de amonio, tales como sulfato de amonio, fosfato de amonio, cloruro de amonio y nitrato de amonio, otros nitratos, aminoácidos tales como glutamato y lisina, extracto de levadura, autolisados de levadura, base de nitrógeno de levadura, hidrolizados de proteína (incluyendo, pero sin limitarse a, peptonas, hidrolizados de caseína tales como

triptona y casaminoácidos), harina de soja, Hy-Soy, caldo de soja trípico, harina de semillas de algodón, extracto de malta, licor de maceración de maíz y melaza.

5 El pH del cultivo puede controlarse mediante la adición de ácido o álcali. Debido a que el pH puede caer durante el cultivo, puede agregarse álcali según sea necesario. Los ejemplos de álcalis adecuados incluyen NaOH y NH₄OH.

10 Los procedimientos de crecimiento celular a modo de ejemplo usados en la producción de un compuesto de interés, tal como 1,4-BDO, incluyen, fermentación discontinua, fermentación semidiscontinua con separación discontinua; fermentación semidiscontinua con separación continua, y fermentación continua con separación continua. Todos estos procedimientos se conocen bien en la técnica. Según el diseño del organismo, las fermentaciones pueden llevarse a cabo en condiciones aerobias o anaerobias. En algunas realizaciones, la temperatura de los cultivos se mantiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 45°C, incluyendo 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 y 44°C.

15 En la fermentación discontinua, se llena un fermentador de tanque (o biorreactor) con los medios preparados para fomentar el crecimiento. La temperatura y el pH para la fermentación microbiana se ajustan adecuadamente, y se añade cualquier complemento adicional. Se añade un inóculo de un organismo que produce 1,4-BDO al fermentador. En la fermentación discontinua, la fermentación se ejecutará generalmente durante un periodo fijo y entonces se aíslan los productos de la fermentación. El procedimiento puede repetirse en ejecuciones discontinuas.

20 En la fermentación semidiscontinua, se añade continua o periódicamente medios nuevos al biorreactor de fermentación. La fermentación semidiscontinua de volumen fijo es un tipo de fermentación semidiscontinua en la que se alimenta una fuente de carbono sin diluir el cultivo. El volumen del cultivo también puede mantenerse prácticamente constante alimentando la fuente de carbono de crecimiento como un gas o líquido concentrado. En otro tipo de cultivo semidiscontinua de volumen fijo, llamado a veces cultivo semidiscontinuo cíclico, se retira periódicamente una porción del cultivo y se usa como punto de partida para un procedimiento semidiscontinuo adicional. Una vez que la fermentación alcanza una determinada fase, se retira el cultivo y se diluye la biomasa hasta el volumen original con agua estéril o medio que contiene el sustrato de alimentación de carbono. La dilución disminuye la concentración de biomasa y da como resultado un aumento en la tasa de crecimiento específica. 25 Posteriormente, a medida que continúa la alimentación, la tasa de crecimiento decrecerá gradualmente a medida que aumente la biomasa y se aproxime al máximo sostenible en el recipiente una vez más, en cuyo momento el cultivo puede diluirse de nuevo. Alternativamente, una fermentación semidiscontinua puede ser de volumen variable. En el modo de volumen variable, el volumen del caldo de fermentación cambia con el tiempo de fermentación ya que se añaden continuamente nutrientes y medios al cultivo sin la retirada de una porción del caldo de fermentación.

35 En una fermentación continua, generalmente se añade continuamente medios nuevos con separación continua de medio gastado, que puede incluir el producto de interés, 1,4-BDO, cuando se secreta el producto. Una característica del cultivo continuo es que puede obtenerse un estado estacionario independiente del tiempo que permite determinar las relaciones entre el comportamiento microbiano y las condiciones ambientales. Se consigue este estado estacionario por medio de un quimiostato, o biorreactor similar. Un quimiostato permite la adición continua de medio nuevo mientras que el líquido de cultivo se retira continuamente para mantener el volumen del cultivo constante. Al alterar la tasa a la que se añade medio al quimiostato, puede controlarse la tasa de crecimiento del microorganismo.

45 La producción continua y/o casi continua de 1,4-BDO puede incluir cultivar un organismo que produce el compuesto en suficientes nutrientes y medio para fomentar y/o casi fomentar el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo bajo tales condiciones puede incluir, por ejemplo, 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Además, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 o 5 semanas o más y hasta varios meses. Alternativamente, los organismos que producen un compuesto de interés pueden cultivarse durante horas, si son adecuados para una aplicación particular. Debe entenderse que las condiciones de cultivo continuas y/o casi continuas también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos periodos a modo de ejemplo. Se entiende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano que produce el compuesto es durante un período de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un propósito deseado.

55 En algunas realizaciones, el cultivo puede llevarse a cabo en condiciones aerobias. Puede controlarse una alimentación de oxígeno al cultivo. El oxígeno puede suministrarse como aire, oxígeno enriquecido, oxígeno puro o cualquier combinación de los mismos. En la técnica se conocen métodos de monitorización de la concentración de oxígeno. El oxígeno puede suministrarse a una determinada velocidad de alimentación o puede suministrarse bajo demanda midiendo el contenido de oxígeno disuelto del cultivo y alimentándose de acuerdo con la intención de mantener un contenido en oxígeno disuelto constante. En otras realizaciones, el cultivo puede llevarse a cabo en condiciones sustancialmente anaerobias. Sustancialmente anaerobia significa que la cantidad de oxígeno es menos de aproximadamente el 10% de saturación para el oxígeno disuelto en medios líquidos. Las condiciones anaerobias incluyen cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera de menos de aproximadamente el 1% de oxígeno.

65 Las fermentaciones pueden realizarse en condiciones anaerobias. Por ejemplo, puede hacerse que el cultivo esté

sustancialmente libre de oxígeno burbujeando en primer lugar el medio con nitrógeno y después sellando el recipiente del cultivo (por ejemplo, se puede sellar los matraces pueden con un septo y tapón engarzado). También pueden utilizarse condiciones microaerobias proporcionando un pequeño agujero para aireación limitada. A escala comercial, las condiciones microaerobias se logran burbujeando un fermentador con aire u oxígeno como en el caso aerobio, pero a una tasa mucho menor y con agitación fuertemente controlada.

En algunas realizaciones, el compuesto de interés, 1,4-BDO, puede producirse en una fermentación discontinua anaerobia usando *E. Coli* genéticamente modificado. En la fermentación, se usa una porción del sustrato de la materia prima para el crecimiento celular y se convierte sustrato adicional en otros subproductos de fermentación. Pueden añadirse componentes de medios tales como sales, tampón, nitrógeno, etc. en exceso a la fermentación para fomentar el crecimiento celular. El caldo de fermentación es, por tanto, una mezcla compleja de agua, el compuesto de interés, subproductos, medios residuales, sustrato residual e impurezas de la materia prima/medios. Es a partir de este caldo de fermentación que el compuesto de interés se aísla y purifica. Una composición de caldo de fermentación a modo de ejemplo se muestra a continuación en la tabla 4.

Tabla 4*

Cantidad	Componente
~100 g/l	1,4-BDO
~5 g/l	masa celular
~10 g/l	subproductos (etanol, ácido acético, ácido 4-hidroxibutírico, GBL, proteínas)
<10 g/l	medios/sales residuales
<1 g/l	sacarosa/glucosa residual
<2 g/l	"no fermentables" (materia prima/impurezas)

*Resto agua

Puede lograrse una concentración de producto de aproximadamente el 5-15% en peso de 1,4-BDO a través de procedimientos de producción biosintética basados en fermentación.

Se entiende que las modificaciones que no afectan sustancialmente la actividad de las diversas realizaciones de esta invención también están incluidas dentro de la definición de la invención proporcionada en el presente documento. Por consiguiente, se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten, la presente invención.

Ejemplo I

Centrifugación del caldo de fermentación

Este ejemplo muestra el uso de una centrífuga de pilas de discos para retirar masa celular y otros sólidos de un caldo de fermentación.

Se aclaró mediante centrifugación el caldo de fermentación de 1,4-butanodiol producido por un *E. coli* genéticamente modificado. Se usó una centrífuga de pilas de discos de GEA-Westfalia para esta etapa. La centrífuga de escala de laboratorio, modelo CTC 1 Whispefuge, tiene una capacidad de cubeta de 1,0 litro y un espacio de contención de sólidos de 0,55 litros. La campana de cubeta, el distribuidor, las pilas de discos y todas las piezas humectadas en el procedimiento están construidos con acero inoxidable de alta resistencia a la tracción. Se controló la alimentación a la unidad de centrifugación usando una bomba peristáltica, manteniéndose la velocidad de flujo constante a aproximadamente 0,25 litros por minuto. Se mantuvo una contrapresión de aproximadamente 15 psi en el sistema estrangulando una válvula reguladora en el flujo del centrifugado de salida. Se hizo funcionar la centrífuga a 12.000 rpm y la alimentación estaba a temperatura ambiental. La centrifugación retira biomasa celular y materiales insolubles del caldo de fermentación. La concentración de biomasa celular y material insoluble viene indicada por la turbidez, tal como se mide mediante densidad óptica (DO) a 600 nm. En la tabla 5 se muestran los datos de turbidez para el caldo de fermentación de alimentación y el centrifugado aclarado. La alimentación era visiblemente turbia y tenía una DO medida de 13,3. El centrifugado aclarado era visualmente mucho más transparente y tenía una DO medida de 0,18. En conjunto, se redujo la turbidez en aproximadamente el 99%, mostrando un aclaramiento excelente por la centrífuga de pilas de discos.

Tabla 5. Turbidez medida mediante densidad óptica (DO) a 600 nm

	DO a 600 nm
Alimentación, caldo de fermentación	13,3
Centrifugado aclarado	0,18

Ejemplo II

Ultrafiltración del caldo de fermentación

5 Este ejemplo muestra la ultrafiltración del caldo de fermentación tras la retirada de masa celular y otros sólidos mediante la centrifugación llevada a cabo en el ejemplo I.

10 Se usó una unidad de filtración de escala de laboratorio de GEA, modelo L, para aclarar adicionalmente el producto producido en el ejemplo 1. Se equipó la unidad de filtración modelo L con membranas de lámina plana 5K PES de Hydranautics. El área de membrana instalada total era de 0,144 m². Se mantuvo la presión transmembrana a aproximadamente 36 psi ajustando el flujo de entrada y la válvula reguladora de contrapresión. Se mantuvo la temperatura de la alimentación a aproximadamente 27°C usando un intercambiador de calor de entrada. Se midió la velocidad de flujo del permeado a lo largo del curso del experimento para determinar el flujo. La tabla 6 muestra el flujo de permeado en litros/m²/h en función del factor de concentración volumétrica (VCF).

15 Tabla 6. Flujo de ultrafiltración frente a VCF

VCF	Flujo
	litros/m ² /h
1,18	15,02
1,44	15,37
1,86	15,29
2,60	15,34
4,33	15,06
6,50	14,79

20 También se tomaron muestras a lo largo del experimento para determinar la calidad del permeado. Se midió la concentración de proteínas en la alimentación y permeado usando el ensayo de Bradford. La tabla 7 muestra la concentración de proteínas en la alimentación, permeado y retenido. La concentración de proteínas disminuyó en aproximadamente el 68% en el permeado en comparación con la alimentación.

Tabla 7. Concentración de proteínas medida usando el ensayo de Bradford

	Concentración de proteínas, mg/l
Alimentación, caldo centrifugado	84,09
Permeado de UF	27,11
Retenido de UF	248,90

25 Ejemplo III

Nanofiltración del caldo de fermentación

30 Este ejemplo muestra la nanofiltración del caldo de fermentación tras la ultrafiltración llevada a cabo en el ejemplo II.

35 Se equipó una unidad de filtración de escala de laboratorio de GEA, modelo L, con membranas de lámina plana de nanofiltración GE DK. El área de membrana instalada total era de 0,072 m². Se usó esta configuración para filtrar el permeado de UF obtenido del ejemplo 2. Se mantuvo la presión transmembrana a aproximadamente 270 psi ajustando el flujo de entrada y la válvula reguladora de contrapresión. Se mantuvo la temperatura de la alimentación a 38°C usando un intercambiador de calor de entrada. Se midió el flujo del permeado a lo largo del curso del experimento para determinar el flujo. La tabla 8 muestra el flujo en litros/m²/h en función del factor de concentración volumétrica (VCF).

40 Tabla 8. Flujo de nanofiltración

VCF	Flujo
	litros/m ² /h
1,33	14,69
1,74	13,41
2,50	10,42

45 También se tomaron muestras a lo largo del experimento para determinar la calidad del permeado. Se midieron ácidos orgánicos usando CL-EM, se analizaron iones de sales usando cromatografía (CI), y se midió glucosa usando un analizador Analox G6. La tabla 9 muestra el porcentaje de rechazo para glucosa, iones y ácidos orgánicos. Al pH de la alimentación, se espera que los ácidos orgánicos estén presentes en su forma de sal. El permeado de nanofiltración también tenía una reducción visual en el color desde un amarillo marcado en la alimentación hasta un

amarillo muy tenue en el producto del permeado.

Tabla 9. Porcentaje de rechazo de glucosa, iones y ácidos orgánicos mediante nanofiltración

Glucosa	Cationes monovalentes	Cationes divalentes	Aniones	Ácidos orgánicos
88,57%	72,80%	100,00%	82,45%	64,39%

5

Ejemplo IV

Intercambio iónico del caldo de fermentación

10 Este ejemplo muestra la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico del caldo de fermentación tras la nanofiltración llevada a cabo en el ejemplo III.

15 Se procesó el permeado de nanofiltración obtenido del ejemplo III a través de una etapa de intercambio iónico para retirar los iones restantes y aclarar adicionalmente el producto. Se usaron Amberlite IR 120H, una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte, y Amberlite IRA 67, una resina de intercambio aniónico de base débil para esta etapa. Se cargaron las columnas de intercambio catiónico y aniónico individuales, de 2 pies de altura x 1 pulgada de diámetro, con $5,3 \times 10^{-3} \text{ ft}^3$ de resinas de intercambio catiónico y aniónico, respectivamente. Se alimentó en primer lugar el permeado de nanofiltración a la columna de intercambio catiónico, y después a la columna de intercambio aniónico a 10 ml/min y 40°C. Se analizó el intercambio iónico para determinar el contenido en iones mediante Cl. Se retiraron todos los iones restantes hasta una concentración de menos de 0,1 mEq/l. En esta etapa también se retiraron todos los ácidos orgánicos restantes. El producto era muy transparente sin color amarillo visible.

20

Ejemplo V

Cristalización evaporativa de una alimentación de síntesis

25 Este ejemplo muestra la retirada de sales de una alimentación de síntesis mediante cristalización evaporativa a escala de laboratorio con la ayuda de un evaporador giratorio.

30 Se realizó la evaporación usando un dispositivo Buchi Rotavap R-205 a temperatura de baño de 50°C y un vacío de ~100 mm de Hg. Se preparó un material de alimentación de síntesis con BDO a aproximadamente el 8% en agua que contenía cationes monovalentes a aproximadamente 92 mEq/l, cationes divalentes 5 mEq/l y aniones 125 mEq/l. Se retiró el agua mediante evaporación de esta mezcla mientras que los iones de sal se dejaron precipitar simultáneamente de la disolución. Se monitorizaron las concentraciones de iones en la disolución a lo largo de la evaporación tomando pequeñas alícuotas de muestra para análisis mediante cromatografía iónica. Antes del análisis, se retiraron mediante filtración los sólidos precipitados. La tabla 10 muestra la concentración de iones en la disolución (normalizada al 100% en la muestra de alimentación) a medida que se concentró el BDO desde aproximadamente el 10 hasta el 95%. Las concentraciones de iones aumentaron hasta el punto de saturación en la disolución (a aproximadamente el 30% de BDO). Tras este punto, la evaporación adicional forzó la cristalización (precipitación) de las sales. En general, esta etapa de cristalización evaporativa provocó que precipitara el 97,5% de los iones de sal de la disolución de BDO.

40

Tabla 10. Precipitación evaporativa de caldo de síntesis

Tiempo, h	BDO, % en peso	% de cationes monoatómicos	% de cationes diatómicos	% de aniones
0	10,00	100,00	100,00	100,00
0,25	15,74	159,75	132,32	161,25
0,5	33,79	344,61	159,73	353,02
0,75	81,32	35,49	0,00	47,24
1,5	94,25	22,43	0,00	20,17

45

Ejemplo VI

Solubilidad en sales

50 Este ejemplo muestra los perfiles de solubilidad de sales en diversos dioles de cadena de carbono pequeña, incluyendo 1,4-BDO.

55 Se midió la solubilidad de sales en diferentes disoluciones que contenían cantidades variables de 1,4-butanodiol (BDO), 1,3-propanodiol (PDO) o 1,2-etanodiol (monoetilenglicol, MEG). Se añadieron las sales a 10 ml de la disolución hasta que se saturó la disolución. Se midió la solubilidad de sales saturadas usando cromatografía iónica. La tabla 11 muestra la solubilidad de sales de cuatro sales diferentes a temperatura ambiente (aproximadamente

20°C). La solubilidad de sales disminuye significativamente con los incrementos en la concentración de BDO lo que demuestra la viabilidad de la retirada de sales mediante cristalización evaporativa. La tabla 12 muestra la solubilidad de sales de tres sales diferentes en diferentes concentraciones de disoluciones de 1,4-BDO, DOP o MEG a temperatura ambiente. Los resultados muestran una disminución de las solubilidades de sales que va de MEG, a DOP, a 1,4-BDO, lo que demuestra que 1,4-BDO es el más adecuado para una cristalización evaporativa entre los tres compuestos.

Tabla 11. Solubilidad de cuatro sales diferentes en disoluciones que contienen 1,4-butanodiol (1,4-BDO) a del 0 al 100%

Disolución (% de 1,4-BDO)	Solubilidad promedio medida (% en peso) ~20°C			
	KH ₂ PO ₄	NaCl	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
0 (Agua)	20,101	32,300	34,354	57,375
33	3,296	10,803	7,346	11,639
80	0,056	2,529	0,035	0,173
90	0,011	0,314	0,015	0,022
95	0,005	0,314	0,028	0,008
98	0,031	0,175	0,011	0,005
100	0,003	0,050	0,009	0,004

Tabla 12. Solubilidad de tres sales diferentes en el 50, el 80 o el 100% de 1,4-butanodiol (BDO), 1,3-propanodiol (PDO) o 1,2-etanodiol (MEG)

Disolvente	Disolución (% de disolvente)	Solubilidad promedio medida (% en peso) ~20°C		
		KCl	Na ₂ SO ₄	(NH ₄)H ₂ PO ₄
BDO	50	8,21	0,63	2,97
	80	0,94	0,04	0,16
	100	0,05	0,00	0,01
PDO	50	8,70	2,38	3,62
	80	1,45	0,10	0,46
	100	0,30	0,01	0,09
MEG	50	14,11	9,42	8,06
	80	7,72	1,81	2,90
	100	4,76	0,69	1,22

Aunque se ha descrito la invención en referencia a las realizaciones divulgadas, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los ejemplos y estudios específicos detallados anteriormente son únicamente ilustrativos de la invención. Por consiguiente, la invención se limita únicamente por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aislamiento de 1,4-butanodiol (1,4-BDO) a partir de un caldo de fermentación que comprende separar una fracción líquida enriquecida en 1,4-BDO de una fracción sólida que comprende células, en el que dicha etapa de separar dicha fracción líquida de dicha fracción sólida comprende ultrafiltración; retirar agua de dicha fracción líquida, retirar sales de dicha fracción líquida, en el que las sales se retiran mediante nanofiltración y mediante intercambio iónico antes de la retirada de agua, y purificar 1,4-BDO.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la ultrafiltración comprende filtrar a través de una membrana que tiene tamaños de poro desde aproximadamente 0,005 hasta aproximadamente 0,1 micrómetros.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de separar dicha fracción líquida de dicha fracción sólida comprende centrifugación con una centrifuga de pilas de discos/centrifuga de pilas de discos o con una centrifuga decantadora.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de separar dicha fracción líquida de dicha fracción sólida comprende microfiltración.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la microfiltración comprende filtrar a través de una membrana que tiene tamaños de poro desde aproximadamente 0,05 micrómetros hasta aproximadamente 5,0 micrómetros.
6. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la nanofiltración comprende filtrar a través de una membrana que tiene un intervalo de tamaño de poro desde aproximadamente 0,0005 hasta aproximadamente 0,005 micrómetros.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se retiran sustancialmente todas las sales antes de la retirada de agua.
8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se retiran sustancialmente todas las sales tras la retirada de una porción de agua.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se logra la retirada de agua mediante evaporación.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que se logra la retirada de agua mediante evaporación con un sistema de evaporador que comprende uno o más efectos.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho sistema de evaporador comprende un evaporador de doble o triple efecto, o
en el que dicho sistema de evaporador comprende además un recompresor térmico, o
en el que dicho sistema de evaporador comprende además un recompresor mecánico, o
en el que dicho sistema de evaporador comprende un evaporador seleccionado del grupo que consiste en un evaporador de película descendente, un evaporador de película descendente de corto recorrido, un evaporador de circulación forzada, un evaporador de placa, un evaporador de circulación, un evaporador de lecho fluidizado, un evaporador de película ascendente, un evaporador de goteo a contracorriente, un evaporador de agitador, y un evaporador de tubo en espiral, o en el que dicho sistema comprende un vacío.
12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha fracción sólida que comprende células se recircula a dicho caldo de fermentación, o
en el que dicha agua retirada se recircula a dicho caldo de fermentación, o
en el que dichas sales retiradas se recirculan a dicho caldo de fermentación.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la purificación de 1,4-BDO comprende destilación.

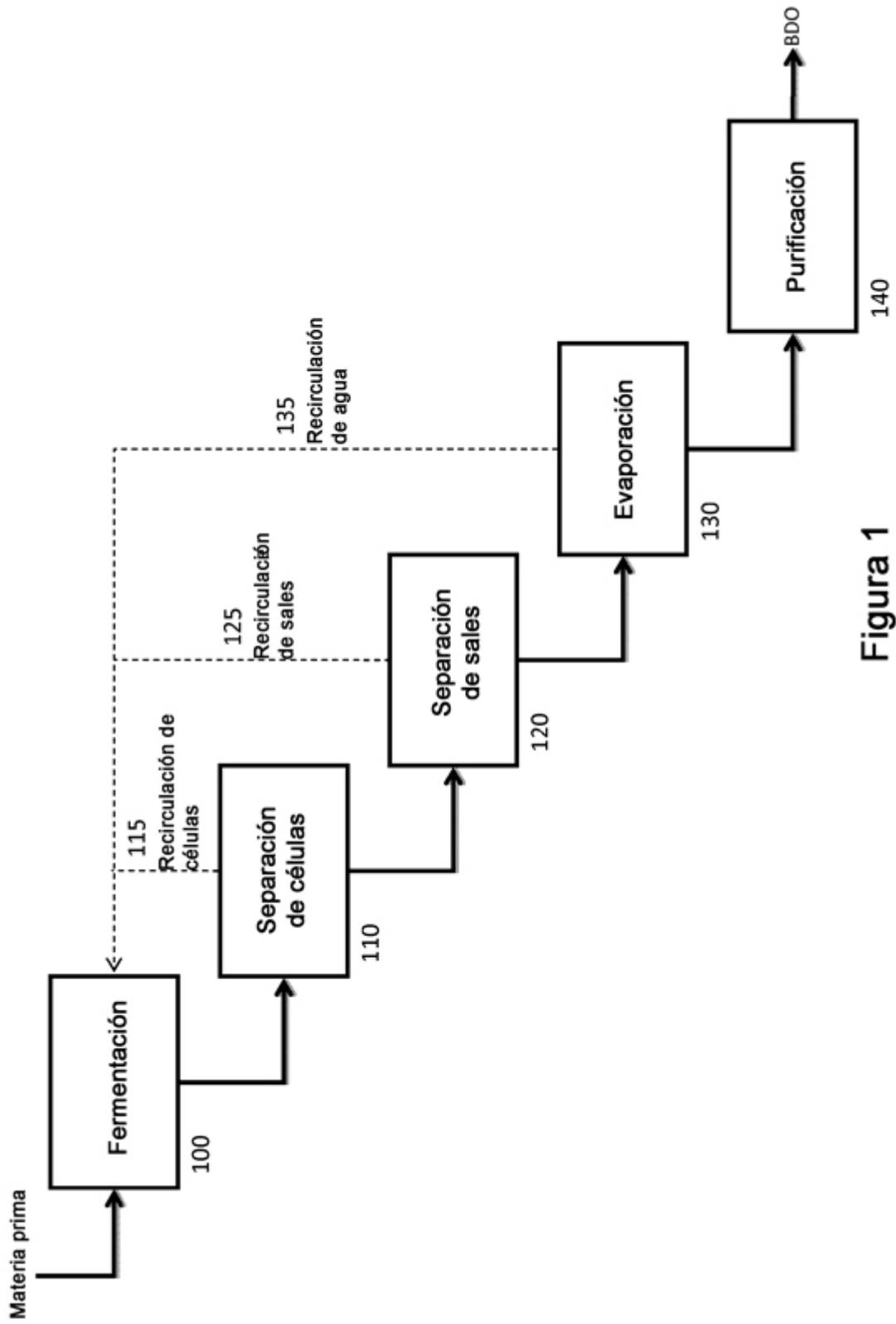


Figura 1

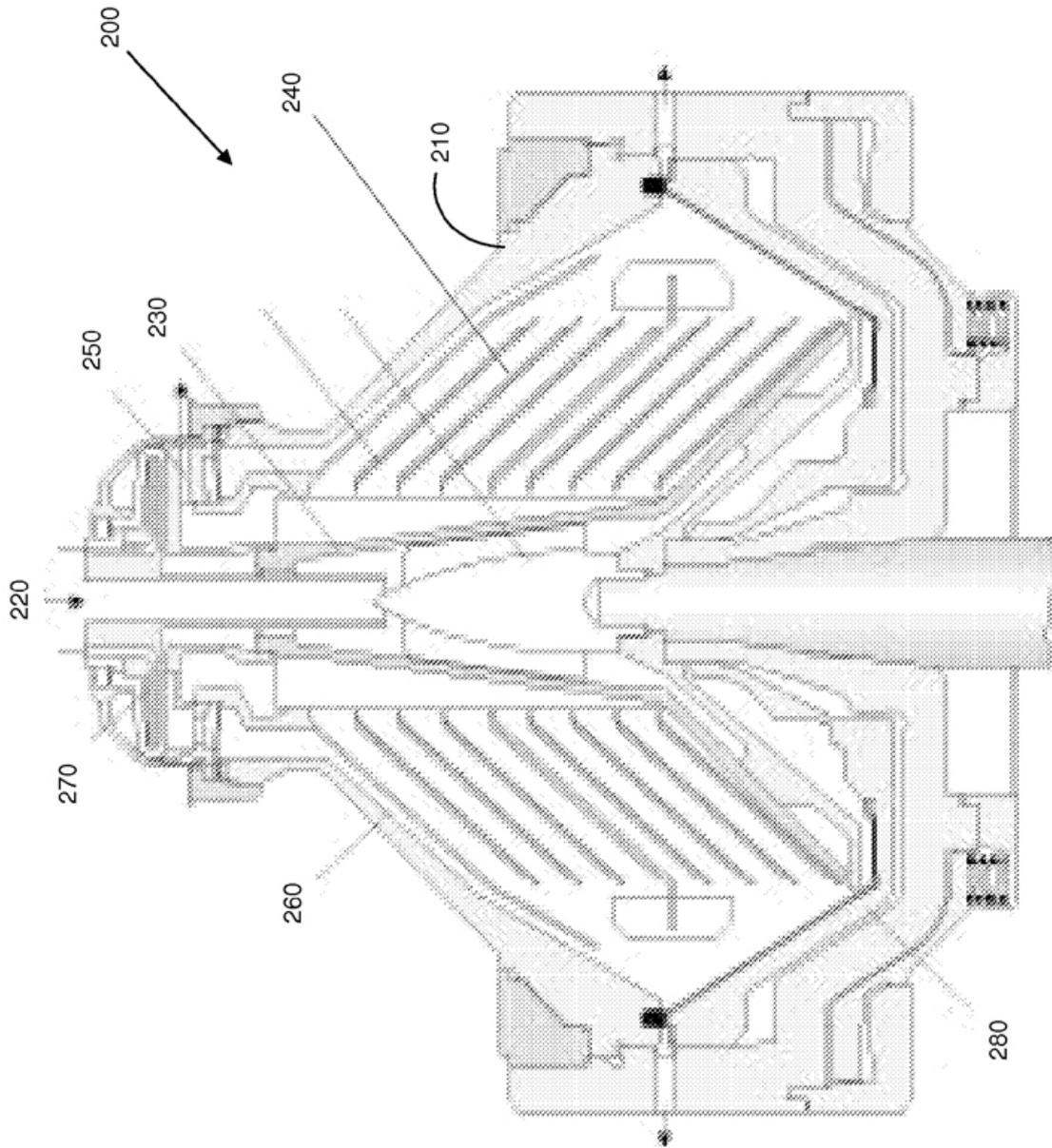


Figura 2

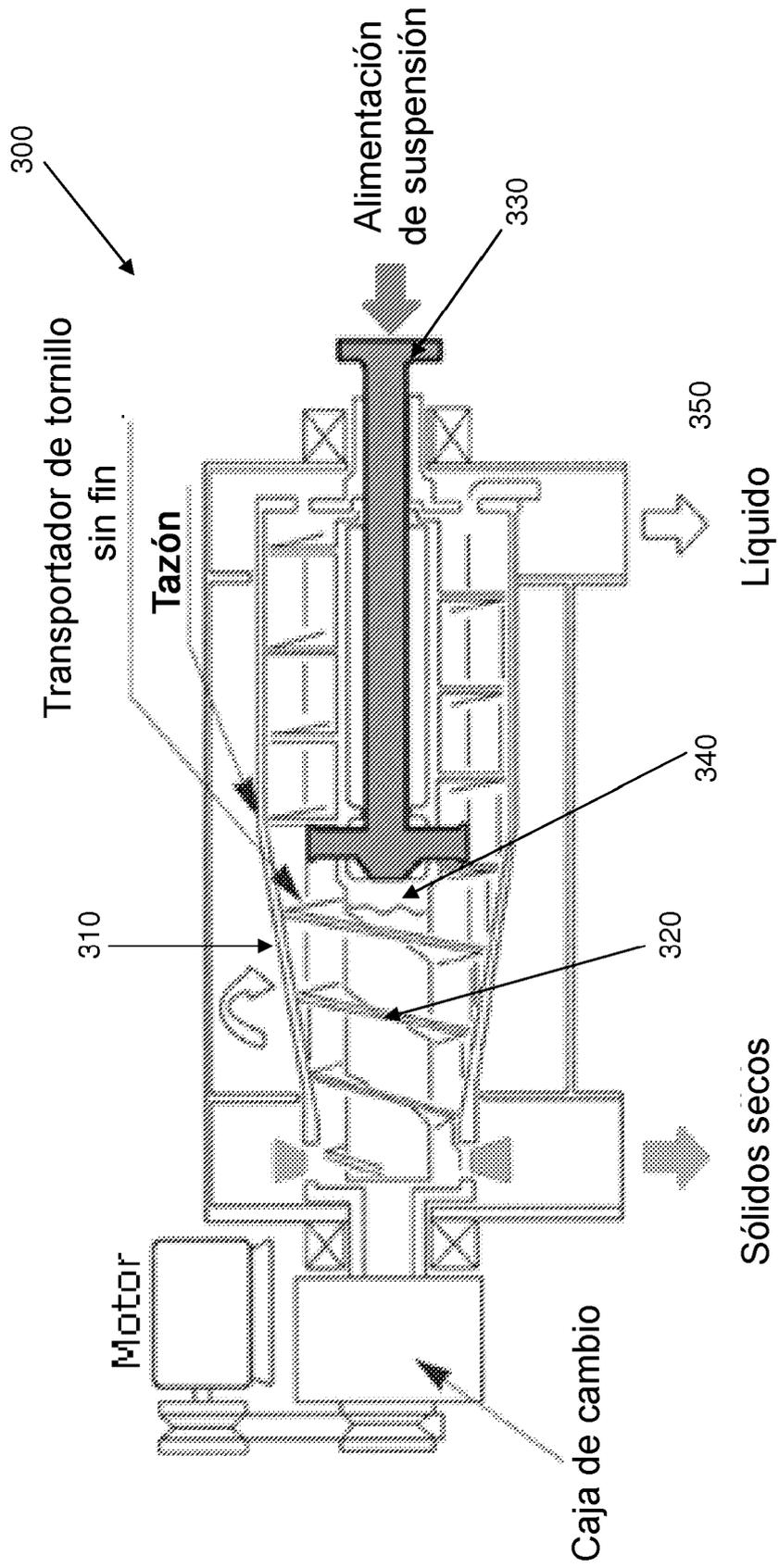


Figura 3

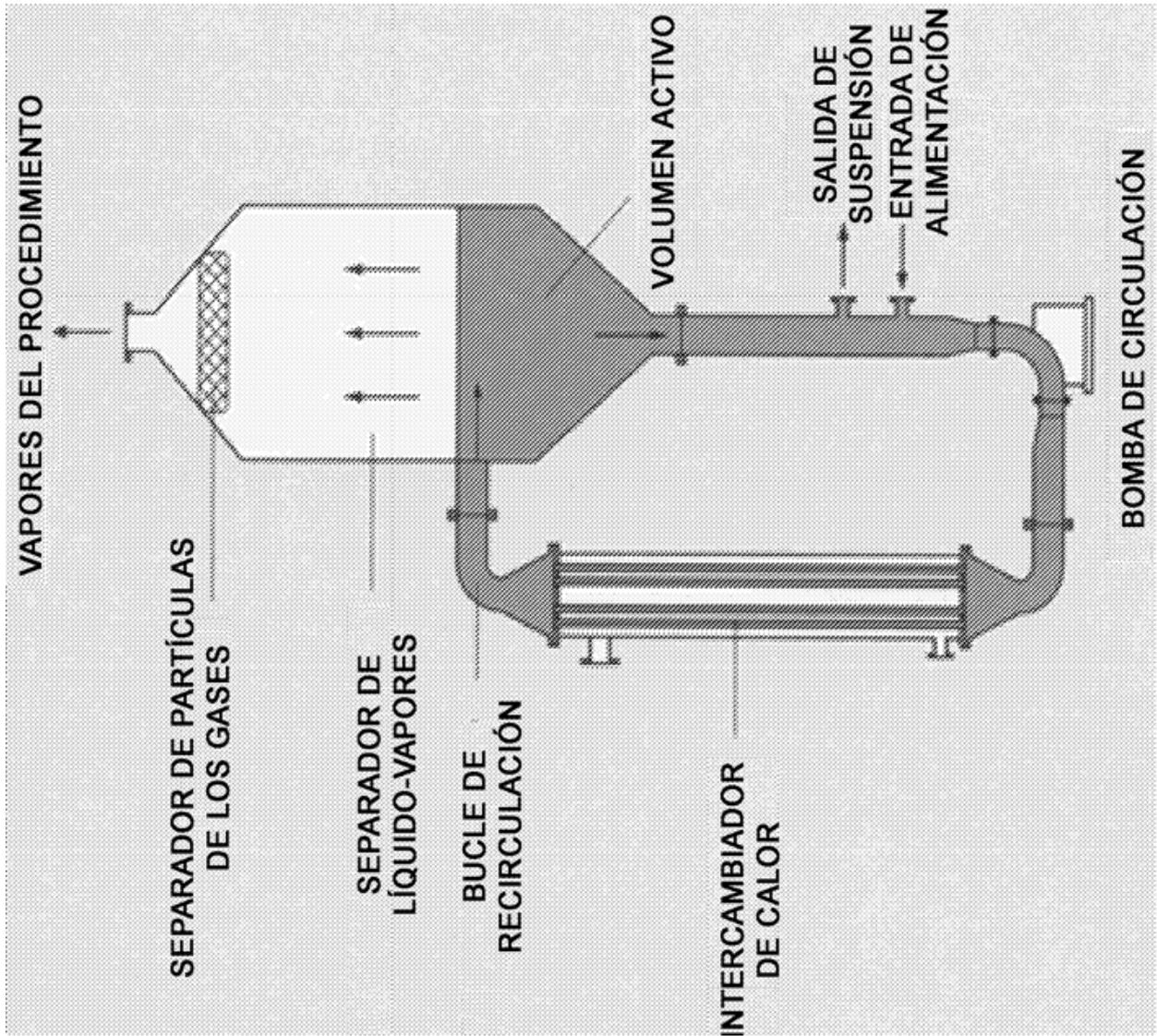


Figura 4

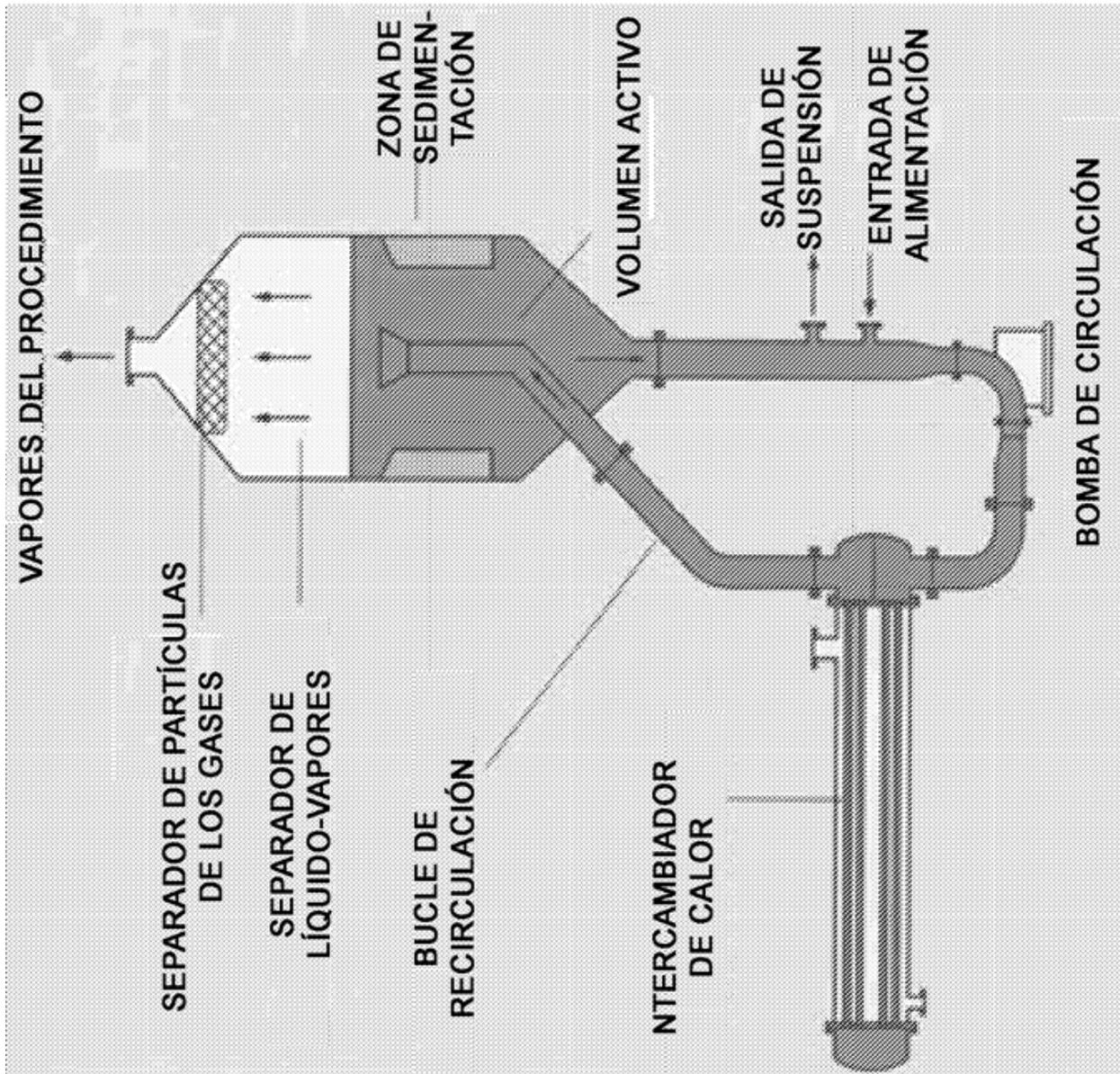


Figura 5

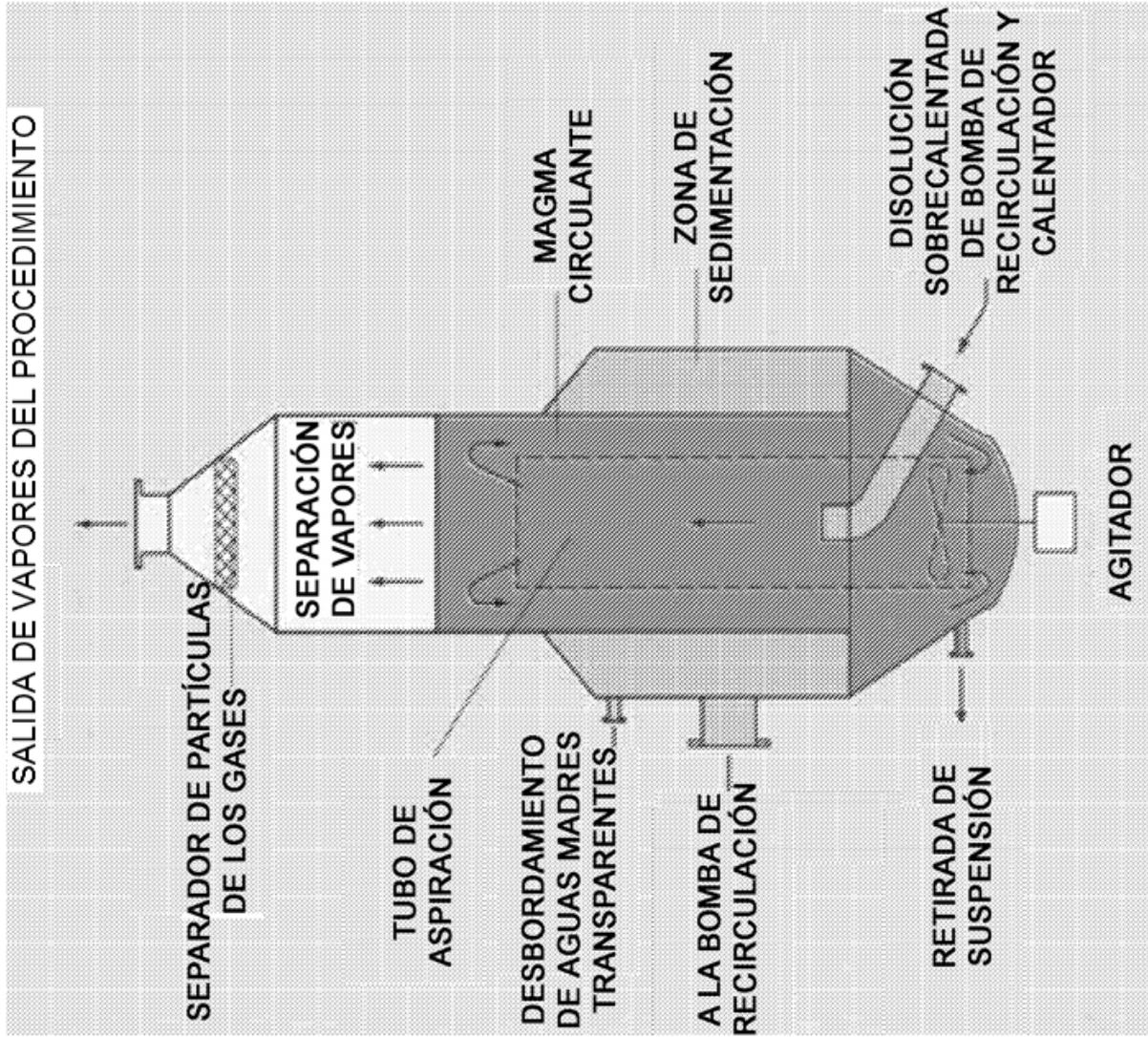


Figura 6

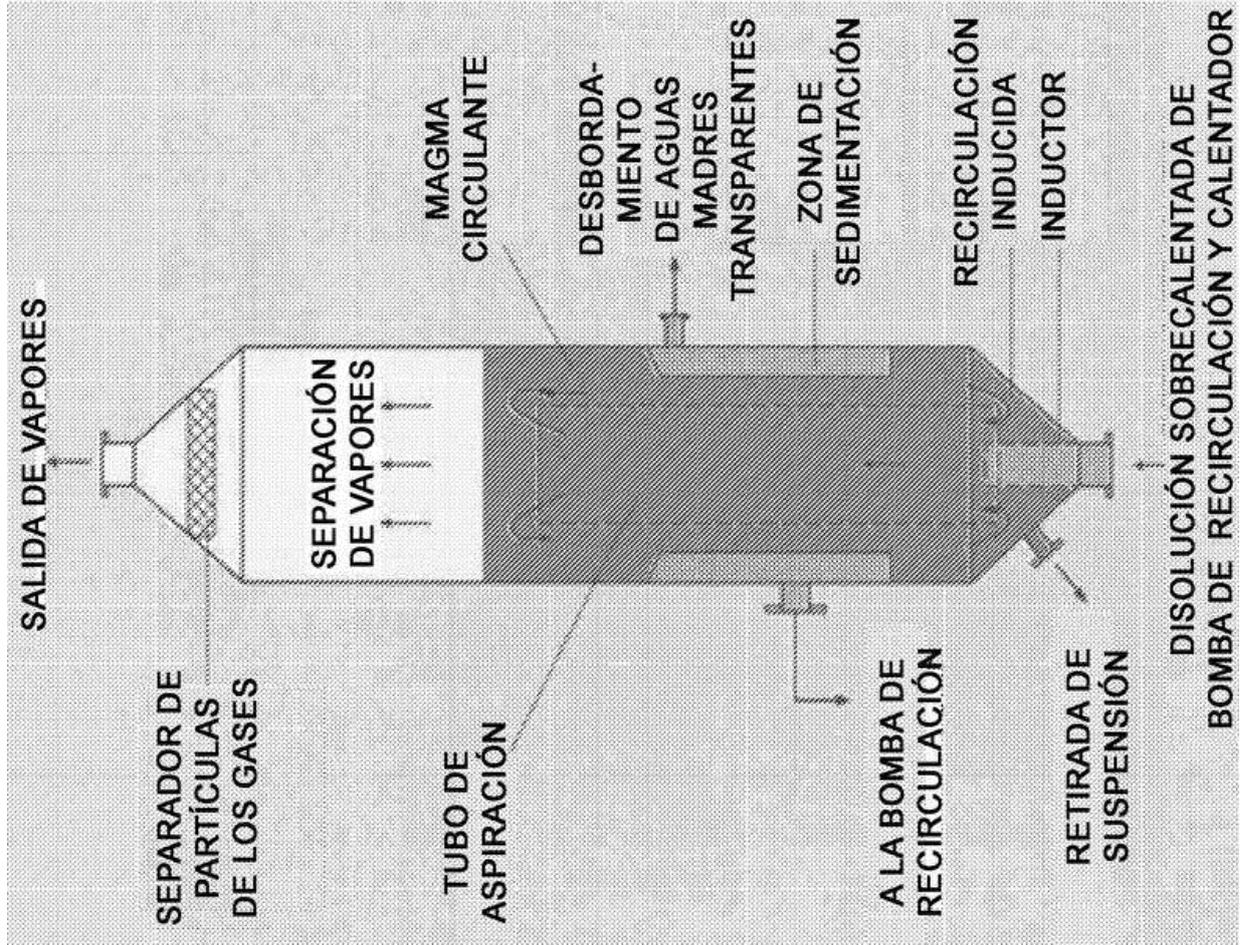


Figura 7

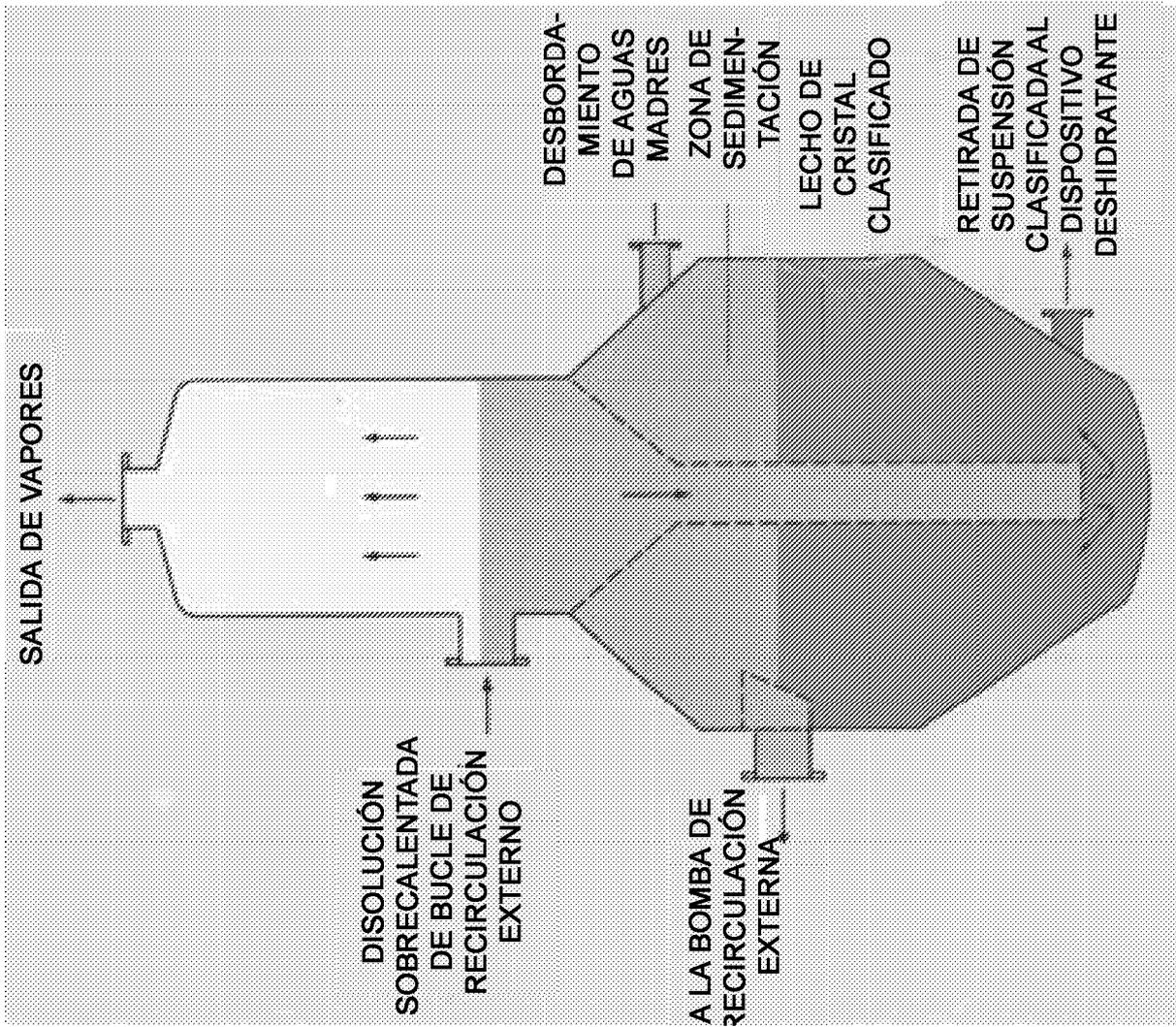


Figura 8

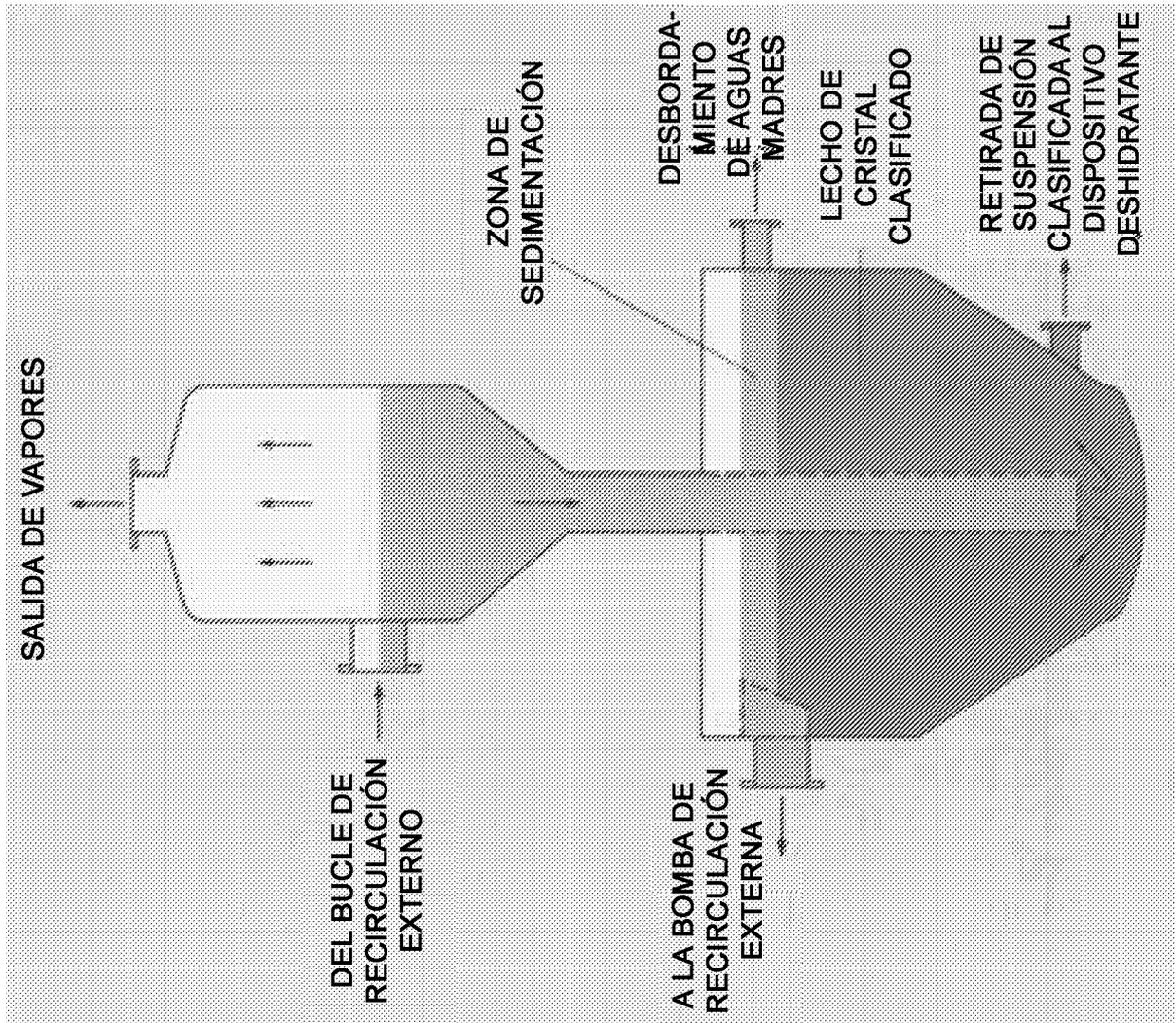


Figura 9

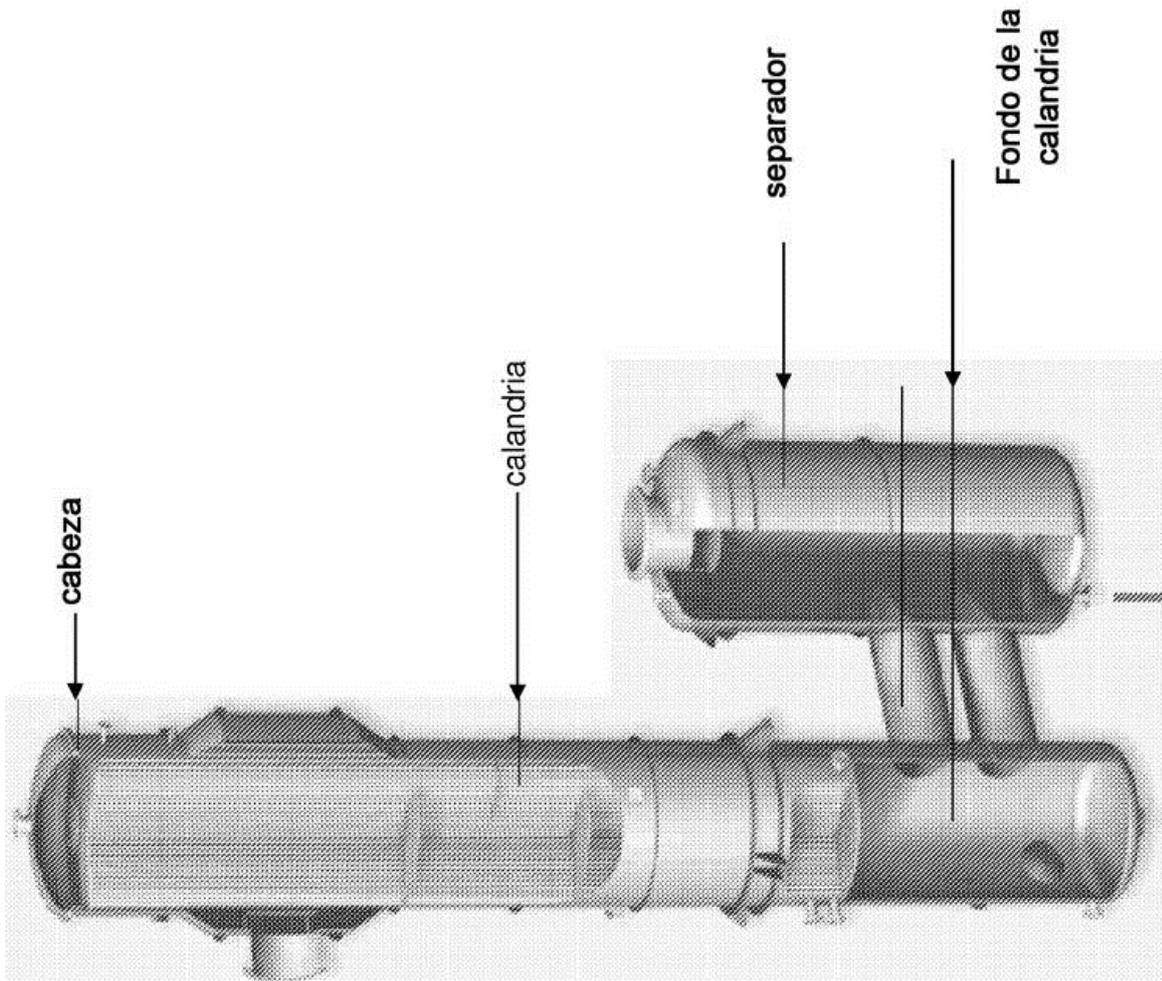


Figura 10

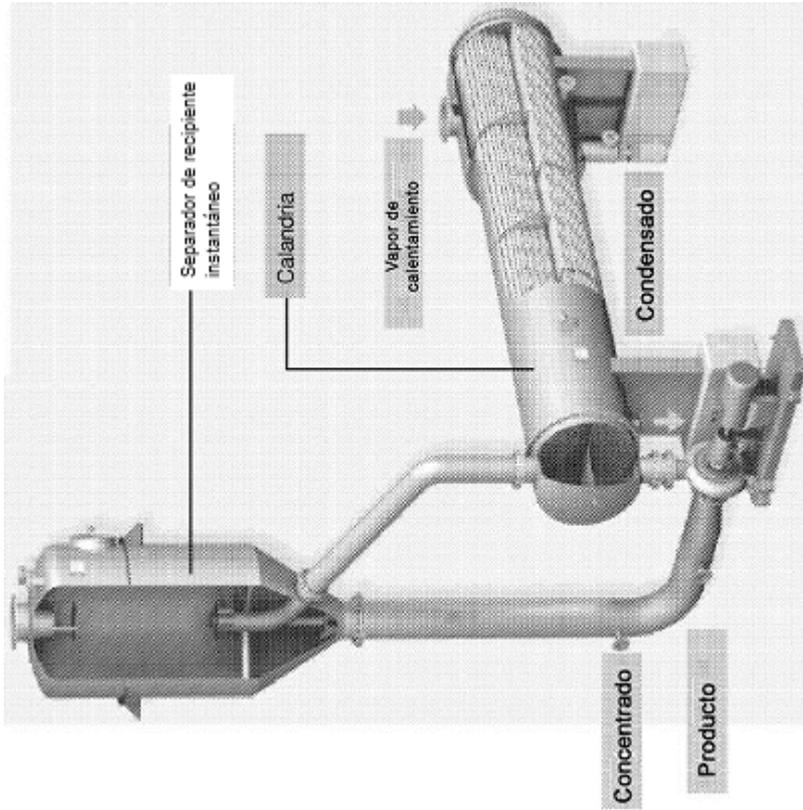


Figura 11

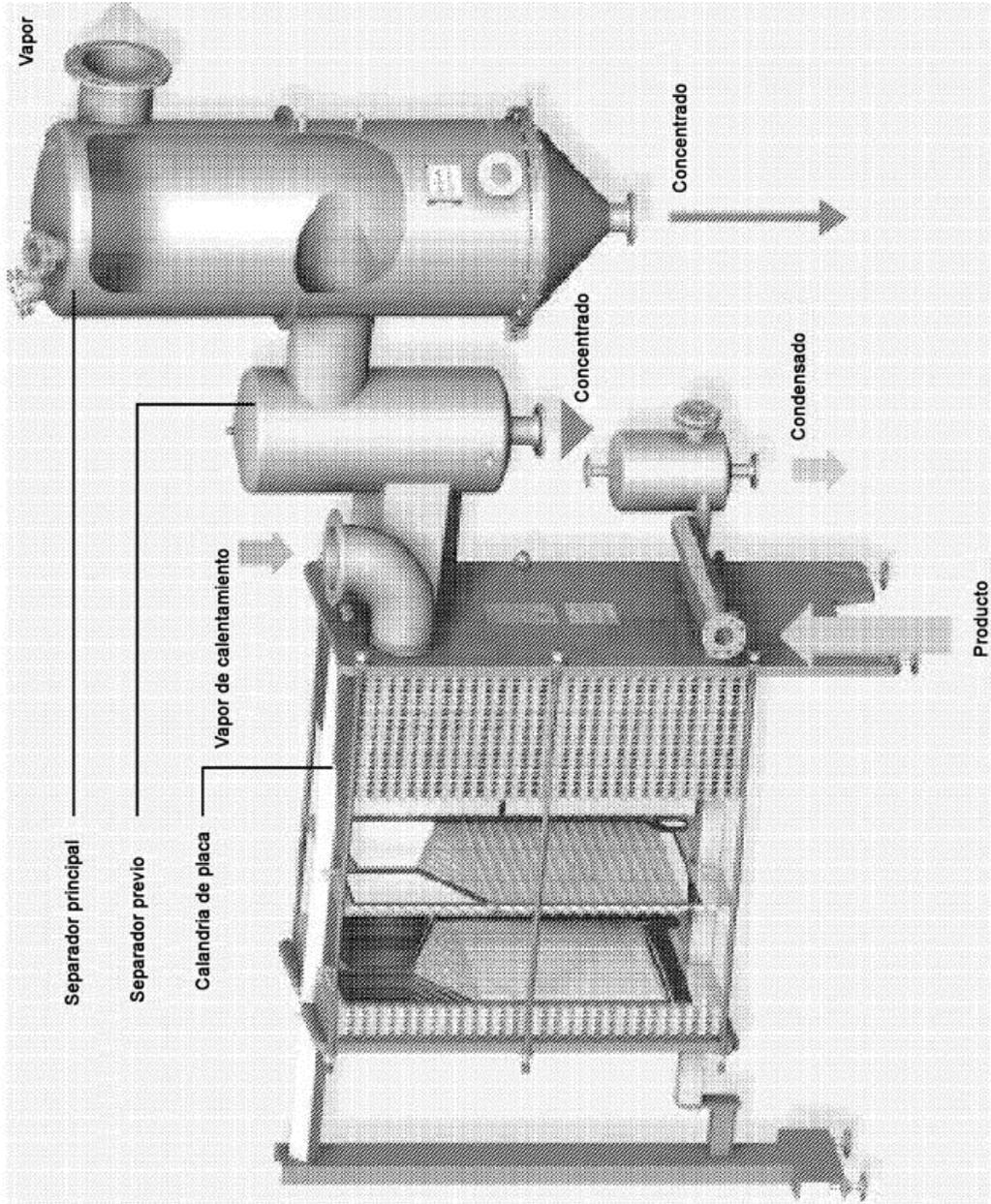


Figura 12

- 1. Calandria
- 2. Separador
- 3. Condensador

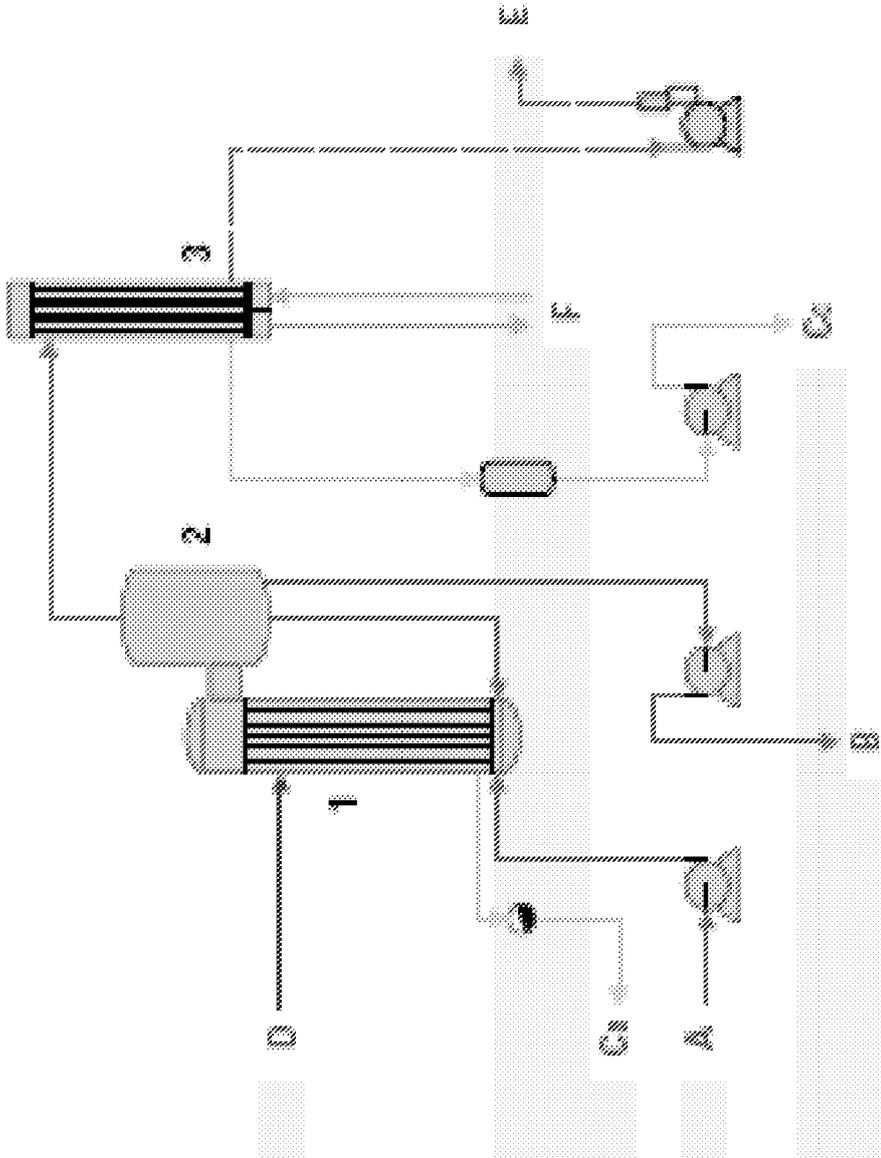


Figura 13

- 1. Calandria de lecho fluidizado
- 2. Separador
- 3. Condensador

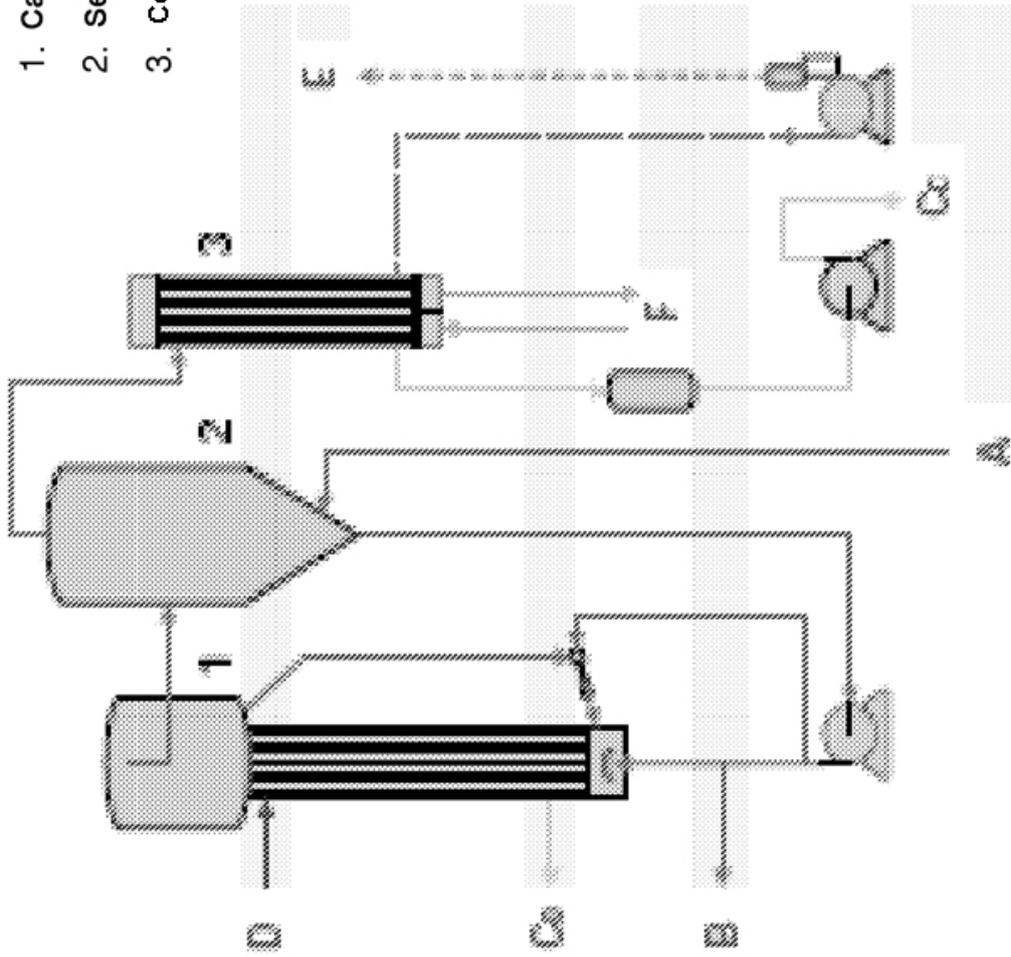


Figura 14

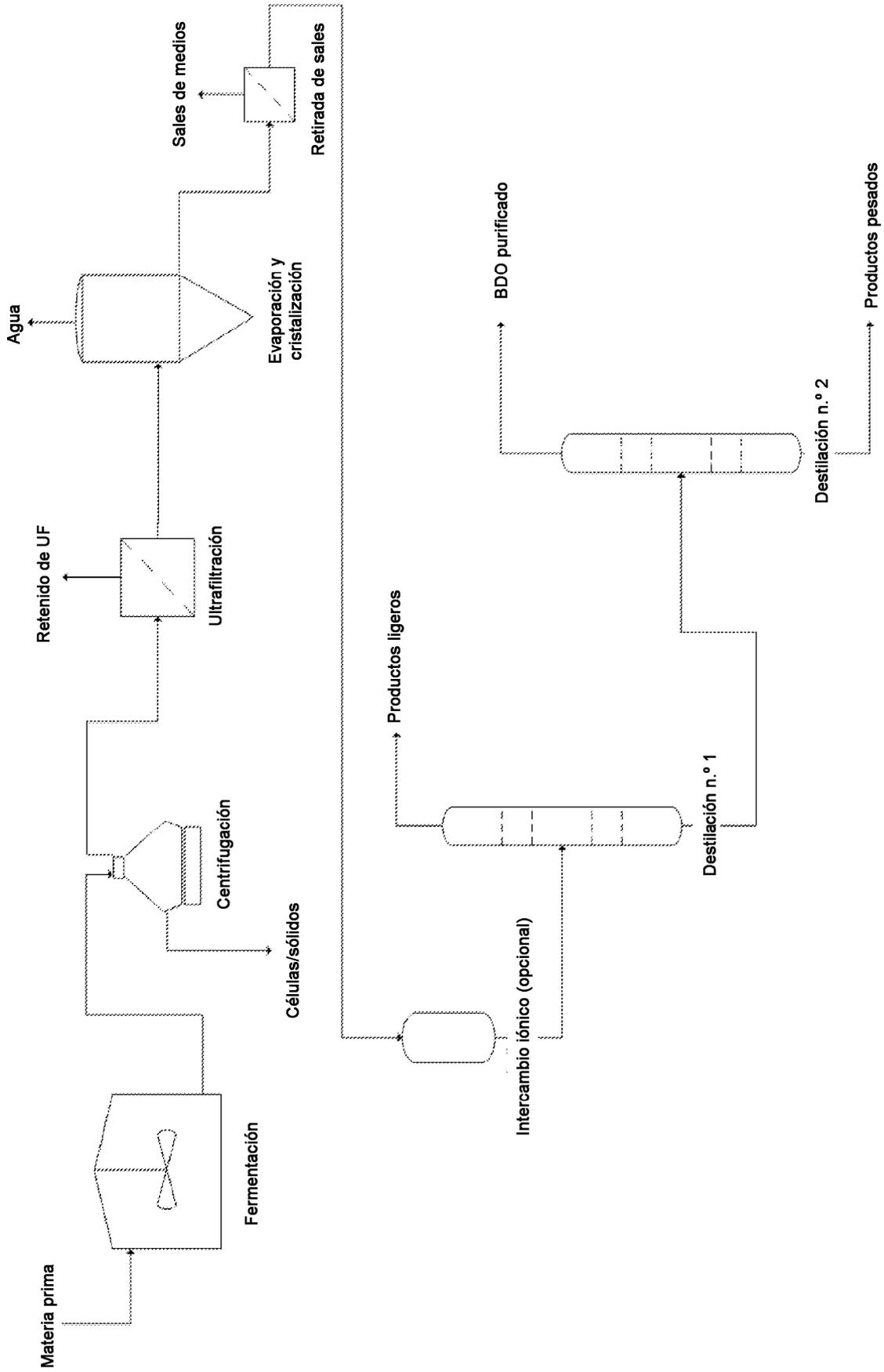


Figura 15

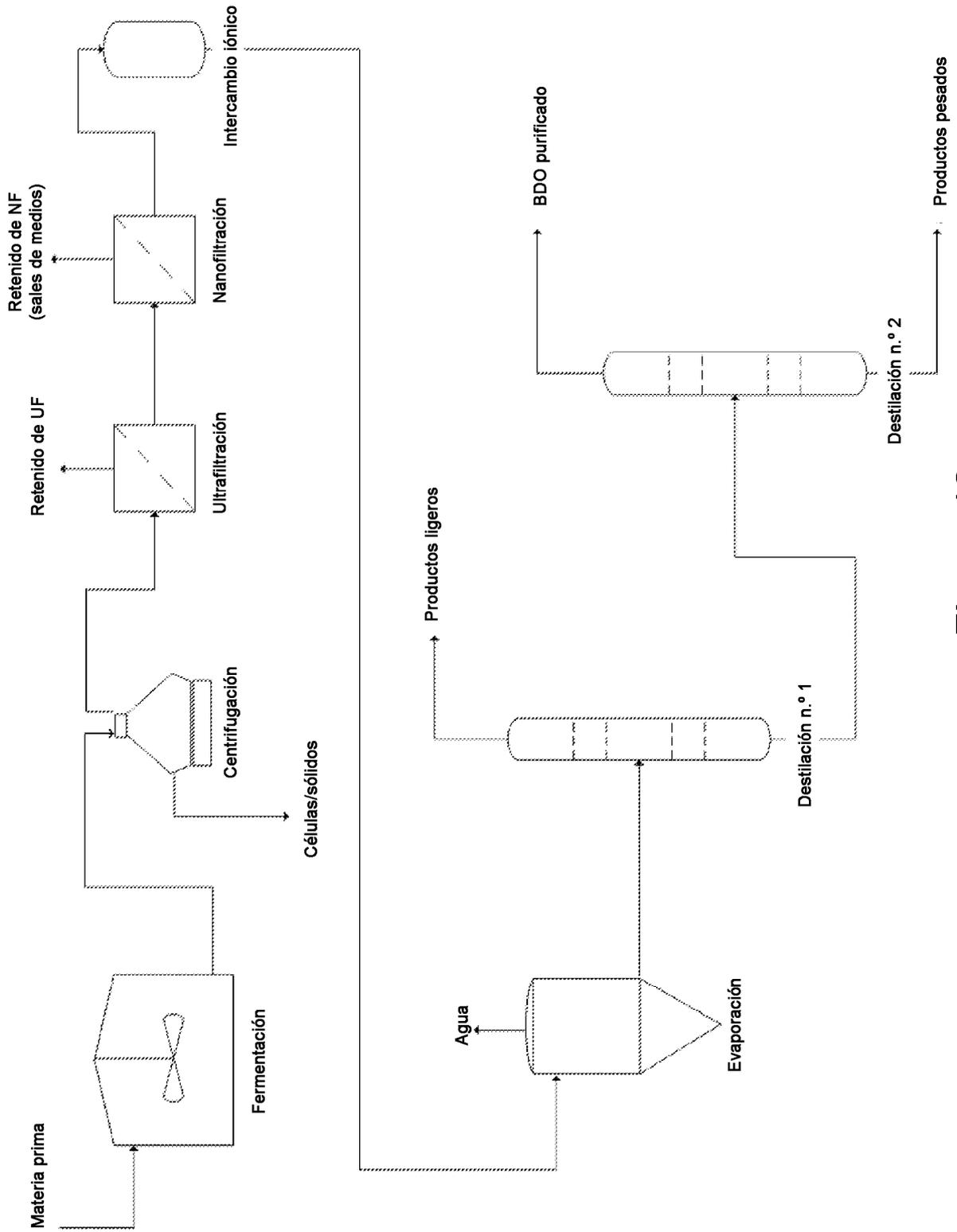


Figura 16